



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.12

(21) Номер заявки
201890428

(22) Дата подачи заявки
2016.08.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ
ИНГИБИТОРЫ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУННОГО ОТВЕТА, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА**

(31) **62/201,461**

(32) **2015.08.05**

(33) **US**

(43) **2018.07.31**

(86) **PCT/EP2016/068726**

(87) **WO 2017/021526 2017.02.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ
(DE)**

(72) Изобретатель:
**Фидлер Вальтер, Веллброк Ясмин,
Штамм Хауке, Клинглер Феликс (DE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A1-2067791
PENDE DANIELA ET AL.: "PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis", MOLECULAR IMMUNOLOGY FEB 2005, vol. 42, no. 4, February 2005 (2005-02), pages 463-469, XP002763679, ISSN: 0161-5890 paragraph [03.2] figure 2 table 1

HOU SHENGKE ET AL.: "Recombinant soluble CD226 protein directly inhibits cancer cell proliferation in vitro", INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY MAR 2014, vol. 19, no. 1, March 2014 (2014-03), pages 119-126, XP002763680, ISSN: 1878-1705 paragraph [03.3]
WO-A2-2015009856
WO 2004/074324 A2

KONG YAXIAN ET AL.: "T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients", CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 15 JUN 2016, vol. 22, no. 12, 15 June 2016 (2016-06-15), pages 3057-3066, XP002763681, ISSN: 1078-0432 the whole document

STAMM HAUKE ET AL.: "Expression of Novel Immune Checkpoint Molecules PVR and PVRL2 Confers a Negative Prognosis to Patients with Acute Myeloid Leukemia and Their Blockade Augments T-Cell Mediated Lysis of AML Cells Alone or in Combination with the BiTE Antibody Construct AMG 330", BLOOD, vol. 126, no. 23, December 2015 (2015-12), XP002763682, & 57TH

ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 05 -08, 2015 the whole document

KRUPKA C. ET AL.: "Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism", LEUKEMIA FEB 2016, vol. 30, no. 2, 4 August 2015 (2015-08-04), pages 484-491, XP002763683, ISSN: 1476-5551 the whole document

LANDRY BREANNE ET AL.: "Progress in RNAi-mediated Molecular Therapy of Acute and Chronic Myeloid Leukemia", MOLECULAR THERAPY. NUCLEIC ACIDS 2015, vol. 4, 12 May 2015 (2015-05-12), page e240, XP002763684, ISSN: 2162-2531 the whole document
Magee: "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991216/pdf/2051-1426-1-S1-P22.pdf",
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991216/pdf/2051-1426-1-S1-P22.pdf, 7 November 2013 (2013-11-07), XP002763686, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991216/pdf/2051-1426-1-S1-P22.pdf[retrieved on 2016-11-01]the whole document

JOHN LIZA B. ET AL.: "Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 2, no. 10, October 2013 (2013-10), XP002765631, the whole document
SANCHEZ-CORREA BEATRIZ ET AL.: "Natural killer cell immunosenescence in acute myeloid leukaemia patients: new targets for immunotherapeutic strategies?", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY: CII APR 2016, vol. 65, no. 4, 10 June 2015 (2015-06-10), pages 453-463, XP002763685, ISSN: 1432-0851 the whole document

ZHU YUWEN ET AL.: "Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 8 FEB 2016, vol. 213, no. 2, 8 February 2016 (2016-02-08), pages 167-176, XP002763687, ISSN: 1540-9538 the whole document
WO-A1-2015048312

Q. ZHOU ET AL.: "Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia", BLOOD, vol. 117, no. 17, 8 March 2011 (2011-03-08), pages 4501-4510, XP055147794, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-10-310425 figure 6
WO-A2-2011159877
WO-A1-2012177788
WO-A1-2015117002

KURODA JUNYA ET AL.: "Targeting activating transcription factor 3 by Galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in

chronic myelogenous leukemia", MOLECULAR CANCER RESEARCH: MCR JUL 2010, vol. 8, no. 7, July 2010 (2010-07), pages 994-1001, XP002765632, ISSN: 1557-3125 the whole document

YOSHIKANE KIKUSHIGE ET AL: "TIM-3 as a therapeutic target for malignant stem cells in acute myelogenous leukemia", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1266, no. 1, 17 August 2012 (2012-08-17), pages 118-123, XP055087894, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06550.x the whole document

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; December 2014 (2014-12), VARGHESE BINDU ET AL.: "A Novel CD20xCD3 Bispecific Fully Human Antibody Induces Potent Anti-Tumor Effects Against B Cell Lymphoma in Mice", XP002765634, Database accession no. PREV201500281422 abstract & BLOOD, vol. 124, no. 21, December 2014 (2014-12), 56TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CA, USA; DECEMBER 06 -09, 2014 ISSN: 0006-4971(print)

WO-A2-2009097394

-
- (57) Изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей ингибитор против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT и конструкцию антитела, способную к привлечению Т-клеток, для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

039307 B1

039307 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, для лечения различных видов рака крови, в частности ОМЛ. Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа и конструкции антител, способные привлекать Т-клетки.

Уровень техники

Среди наиболее перспективных подходов к активации терапевтического противоопухолевого иммунитета находится блокирование контрольных точек иммунного ответа. Контрольные точки иммунного ответа относятся к множеству ингибиторных путей, вшитых в иммунную систему, которые играют важнейшую роль в поддержании аутоотолерантности и модуляции длительности и амплитуды физиологических иммунных ответов в периферических тканях с целью сведения к минимуму побочного повреждения ткани.

В общем случае Т-клетки не отвечают на эти взаимодействия лиганд-рецептор, если они сначала не распознали свой специфический антиген посредством ТКР. Многие лиганды связываются с множеством рецепторов, некоторые из которых доставляют костимуляторные сигналы, а другие доставляют ингибиторные сигналы. В общем случае пары костимуляторных-ингибиторных рецепторов, которые связывают один и тот же лиганд или лиганды, такие как CD28 и ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4 (CTLA4), демонстрируют разную кинетику экспрессии, при этом костимуляторный рецептор экспрессируется в наивных и покоящихся Т-клетках, а экспрессия ингибиторного рецептора обычно повышается после активации Т-клеток. Одним важным семейством мембраносвязанных лигандов, которые связывают как костимуляторные, так и ингибиторные рецепторы, является семейство B7. Все представители семейства B7 и их известные лиганды принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов. Многие рецепторы для недавно идентифицированных представителей семейства B7 еще не идентифицированы. Представители семейства TNF, которые связываются с специфическими молекулами семейства рецепторов TNF, представляют второе семейство регуляторных пар лиганд-рецептор. Эти рецепторы главным образом доставляют костимуляторные сигналы при привлечении их специфическими лигандами.

Другая основная категория сигналов, которые регулируют активацию Т-клеток, поступает от растворимых цитокинов в микроокружении. Взаимодействие между Т-клетками и АПК (антигенпрезентирующие клетки) является двухсторонним. В некоторых случаях оно происходит, когда лиганды сами передают сигнал АПК. В других случаях активированные Т-клетки повышают экспрессию лигандов, таких как CD40L, которые привлекают специфические рецепторы на АПК.

Однако опухоли используют определенные пути контрольных точек иммунного ответа в качестве основного механизма иммунной резистентности, в частности, против Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам. Так как инициация многих контрольных точек иммунного ответа происходит посредством взаимодействий рецептор-лиганд, их можно блокировать антителами или модулировать рекомбинантными формами лигандов или рецепторов. Антитела к CTLA4 были первыми в этом классе иммунотерапевтических средств, которые получили одобрение FDA. Предварительные клинические исследования с блокаторами дополнительных белков контрольных точек иммунного ответа, таких как PD-1, указывают на наличие широких и разнообразных возможностей для усиления противоопухолевого иммунитета с потенциалом к получению долговременных клинических ответов. Например, Krupka et al. ("Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE® antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism.", LEUKEMIA FEB 2016, vol. 30, no. 2, pages 484-491) раскрывает применение анти-PD-1 антитела в комбинации с конструкцией антитела анти-CD33/CD3 BiTE® для уничтожения клеток ОМЛ in vitro.

Таким образом, иммунотерапия рака также сфокусирована на разработке агентов, которые могут делать неопластические и раковые клетки более поддающимися уничтожению иммунной системой, в частности, Т-клетками. Это можно осуществить, например, путем вмешательства в функцию белков контрольных точек иммунного ответа как с помощью лигандов, так и рецепторов, или и тех и других. Хотя количество информации о молекулах контрольных точек иммунного ответа, а также количество информации о том, какие молекулы контрольных точек иммунного ответа какими раковыми клетками используются, увеличивается, неизвестно, какие из них могут использоваться какими неопластическими, а затем и раковыми клетками для уклонения от иммунной системы, тем самым приобретения способности к неконтролируемому росту. Например, на данный момент известно, что различные виды рака крови, в частности острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), уклоняются от иммунной системы. Хотя предполагается, что здесь могут быть задействованы белки контрольных точек иммунного ответа, доказательств этого все еще нет. Sanchez-Correa Beatriz et al. ("Natural killer cell immunosenescence in acute myeloid leukaemia patients: new targets for immunotherapeutic strategies?", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY: CII APR 2016, vol. 65, no. 4, pages 453-463) описывает механизм анергии NK клеток при ОМЛ, обсуждает регуляцию NK клеток через лиганды TIGIT и DNAM-1 (т.е. CD112, CD155) и раскрывает экспрессию

CD112 на клетках ОМЛ. Hou Shengke et al. ("Recombinant soluble CD226 protein directly inhibits cancer cell proliferation in vitro.", INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY MAR 2014, vol. 19, no. 1, March 2014, pages 119-126) раскрывает применение sCD266 (растворимый CD226, т.е. DNAM-1) для ингибирования роста клеток лейкоза (раздел 3.3). CD226 представляет собой рецептор как для CD112, так и для CD155. Следовательно, sCD226 является по меньшей мере ингибитором взаимодействия CD112/CD226 и CD155/CD226. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в обеспечении средств и способов для преодоления влияния белков контрольных точек иммунного ответа, чтобы сделать клетки различных видов рака крови более доступными для механизмов уничтожения иммунной системы.

Соответственно техническая задача, которая лежит в основе настоящей заявки, состоит в удовлетворении этой неудовлетворенной потребности, т.е. в обеспечении средств и способов для того, чтобы сделать клетки различных видов рака крови, в частности клетки ОМЛ, более поддающимися уничтожению иммунной системой организма. В общем случае решение состоит в получении ингибиторов лигандов контрольных точек иммунного ответа CD112, CD155, их рецептора TIGIT для применения в лечении различных видов рака крови, в частности ОМЛ. Указанное решение также отображено в формуле изобретения, его варианты осуществления приведены в описании, его примеры приведены в прилагаемых примерах и проиллюстрированы на фигурах.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей указанные иммуномодулирующие соединения и в качестве одного из аспектов раскрытия Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR Т-клетки), для лечения острого миелоидного лейкоза. Более того, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая указанные иммуномодулирующие соединения и конструкцию антитела, способную к привлечению Т-клеток.

В этой связи в настоящем изобретении уделяется внимание потребности в разработке применения новой фармацевтической композиции, содержащей контрольные точки иммунного ответа, в терапии рака крови, в частности терапии ОМЛ, на которые могут влиять разнообразные ингибиторы, с целью обработки раковых клеток с развитым механизмом уклонения от иммунологического надзора. В частности, авторы настоящего изобретения открыли CD112, CD155 и TIGIT и в качестве одного из аспектов раскрытия галектин-9 и TIM-3 как новые белки контрольных точек иммунного ответа, на которые можно осуществлять специфическое нацеливание для терапии различных видов рака крови, в частности ОМЛ. Таким образом, ингибиторы против CD112, CD155 и/или TIGIT и в качестве одного из аспектов раскрытия галектина-9 и/или TIM-3 приводят к значительному повышению клеточного лизиса клеток ОМЛ. Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что влияние указанных ингибиторов контрольных точек иммунного ответа может быть даже более эффективным в комбинации с Т-клетками в качестве одного из аспектов раскрытия с химерными антигенными рецепторами (CAR Т-клетками) или конструкциями антител, способными к привлечению Т-клеток, такими как биспецифическая конструкция привлекающего Т-клетки антитела (BiTE) AMG 330, имеющая двойную специфичность в отношении CD3 и CD33. Таким образом, соединения и композиция согласно настоящему изобретению создают возможность новой терапевтической опции для пациентов с раком крови, в частности ОМЛ, тем самым обеспечивая перспективный путь для того, чтобы сделать клетки рака крови более поддающимися уничтожению защитной системой организма. Соответственно в настоящем изобретении указаны возможности для усиления противоопухолевого иммунитета и предложены соединения и композиция, которые вероятно имеют потенциал в отношении достижения долговременных клинических ответов.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей ингибитор против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT, для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Первая группа таких ингибиторов ингибирует взаимодействие между лигандами и рецепторами белков контрольных точек иммунного ответа, как описано в настоящем изобретении. Таким образом, предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD112 ингибирует взаимодействие между CD112 и TIGIT. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD155 ингибирует взаимодействие между CD155 и TIGIT. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD112. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против галектина-9 ингибирует взаимодействие между галектином-9 и TIM-3. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIM-3 ингибирует взаимодействие между TIM-3 и галектином-9. Ингибитор согласно настоящему изобретению может представлять собой конструкцию антитела.

Также в качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать CAR Т-клетку. Ингибитор согласно настоящему изобретению также может содержать конструкцию антитела, которая способна к привлечению Т-клеток. Конструкция антитела, способная к привлечению Т-клеток, предпочтительно содержит связывающий CD3 домен и дополнительный связывающий домен, нацеленный на поверхностную молекулу,

экспрессируемую на клетках ОМЛ. Указанная поверхностная молекула может быть выбрана из группы, состоящей из CD33, CD19 и Flt3. Конструкция антитела, способная к привлечению Т-клеток, предпочтительно представляет собой связывающую молекулу, способную связываться с CD3ε. Ингибитор согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать иммуностимулятор.

Дополнительная группа ингибиторов контрольных точек иммунного ответа снижает экспрессию белков контрольных точек иммунного ответа, как описано в настоящем изобретении. Соответственно предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD112 снижает экспрессию CD112. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD155 снижает экспрессию CD155. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIGIT снижает экспрессию TIGIT. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против галектина-9 снижает экспрессию галектина-9. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIM3 снижает экспрессию TIM-3. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению представляет собой иРНК. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению приводит к нокауту CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3. Нокаут можно осуществлять с помощью технологии CRISPR/cas9.

Другая группа ингибиторов контрольных точек иммунного ответа модулирует внутриклеточную сигнализацию белков контрольных точек иммунного ответа, как описано в настоящем изобретении. Таким образом, предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD112 модулирует внутриклеточную сигнализацию CD112. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD155 модулирует внутриклеточную сигнализацию CD155. Предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIGIT модулирует внутриклеточную сигнализацию TIGIT. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против галектина-9 модулирует внутриклеточную сигнализацию галектина-9. В качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против TIM-3 модулирует внутриклеточную сигнализацию TIM-3.

В дополнительном аспекте раскрытия относится к фармацевтической композиции, содержащей ингибитор против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR), галектин-9, TIM-3 и/или TIGIT и CAR Т-клетку. Указанный ингибитор против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT может представлять собой конструкцию антитела.

В дополнительном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT и конструкцию антитела, способную к привлечению Т-клеток. Указанная конструкция антитела, способная к привлечению Т-клеток, может содержать связывающий CD3 домен и дополнительный связывающий домен, нацеленный на поверхностную молекулу, экспрессируемую на клетках ОМЛ.

Стоит отметить, что в контексте настоящего изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если иное четко не следует из контекста. Таким образом, например, "реагент" включает в себя один или более таких разных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или замещены описанными в настоящем изобретении способами.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предвещающий ряд элементов, следует понимать как такой, который относится к каждому элементу ряда осуществления в настоящем изобретении. Термин "и/или" во всех случаях его употребления в настоящем изобретении включает значения "и", "или" или "все или любая другая комбинация элементов, объединяемых указанным термином".

В контексте данного документа термин "около" или "приблизительно" означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% заданного значения или диапазона. При этом он также включает конкретное число, например "около 20" включает 20.

Термины "менее чем" или "более чем" включают конкретное число, например "менее чем 20" означает менее чем или равно. Аналогично, "более чем" или "больше" означает "более чем или равно" или "больше или равно" соответственно.

В тексте данного описания или в нижеприведенной формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов. При употреблении в контексте настоящего изобретения термин "содержащий" может быть заменен термином "включающий" или "включающий в себя" или иногда в контексте настоящего изобретения термином "имеющий".

При употреблении в контексте настоящего изобретения выражение "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не упомянутый в заявляемом элементе. При употреблении в контексте настоящего изобретения выражение "состоящий преимущественно из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают материального влияния на основу и новые характеристики заявляемого пункта.

В каждом случае в настоящем изобретении любые из терминов "содержащий", "состоящий преимущественно из" и "состоящий из" можно заменить любым из двух других терминов.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами, материалами, реагентами и веществами и т. д., описанными в настоящем изобретении, и, следовательно, может варьироваться. Используемая в настоящем изобретении терминология имеет цель всего лишь описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не подразумевает ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Экспрессия белков PVR, PVRL2 и галектина-9 в разных линиях клеток ОМЛ по сравнению с МКПК от здоровых доноров. Экспрессию белка определяли с помощью FACS. Все исследуемые линии клеток ОМЛ являются приблизительно на 100% позитивными в отношении экспрессии белков PVR и PVRL2. В отличие от них только 52 и 40% МКПК от здоровых доноров экспрессируют PVR и PVRL2 соответственно. Плотность белка (принятая на основании медианной интенсивности флуоресценции (МИФ)) для PVR и PVRL2 является очень высокой по сравнению с очень низкой плотностью на МКПК. Экспрессия и плотность белка галектина-9 является низкой и сравнимой с МКПК от здоровых доноров. В левой колонке приведена экспрессия PVR, в средней колонке приведена экспрессия PVRL2, в правой колонке приведена экспрессия галектина-9.

Фиг. 2. Экспрессия белков PVR и PVRL2 первичными бластными клетками пациентов с ОМЛ. МНК пациентов с впервые диагностированным ОМЛ выделяли и одновременно окрашивали в отношении CD33 и PVR или PVRL2 соответственно. На графике изображена процентная доля позитивных в отношении PVR или PVRL2 клеток в пределах популяции CD33. В левой колонке приведена экспрессия PVRL2, в правой колонке приведена экспрессия PVR.

Фиг. 3. In vitro анализ для определения иницируемой МКПК цитотоксичности с применением блокирующих антител против PVR и PVRL2 в комбинации с AMG330.

Фиг. 4. Блокирующие PVR антитела усиливают уничтожение в анализах цитотоксичности (линия клеток MV441). Блокирующее PVR антитело D171 значительно усиливает уничтожение клеток дозозависимым образом через 24 ч. На нижнем графике показан эксперимент 1, на верхнем графике показан эксперимент 2.

Фиг. 5. Блокирование PVR приводит к значительному повышению клеточного лизиса клеток MV4-11. PVR-Ab (антитело против PVR) имеет действие, сравнимое с действием AMG330, применяемым в одиночку. Совокупное действие можно наблюдать для комбинации AMG330 и PVR-Ab.

Фиг. 6. Блокирующие PVR антитела усиливают уничтожение в анализах цитотоксичности (линия клеток KG-1). Блокирующее PVR антитело D171 значительно усиливает уничтожение клеток дозозависимым образом через 24 ч. На нижнем графике показан эксперимент 1, на верхнем графике показан эксперимент 2.

Фиг. 7. Блокирование PVR приводит к значительному повышению клеточного лизиса клеток KG-1. PVR-Ab имеет действие, сравнимое с действием AMG330, применяемым в одиночку. Совокупное действие можно наблюдать для комбинации AMG330 и PVR-Ab.

Фиг. 8. Блокирующие PVRL2 антитела усиливают уничтожение в анализах цитотоксичности (линия клеток MV4-11). Антитело к PVRL2 L-14 значительно усиливает уничтожение клеток через 24 ч. На нижнем графике показан эксперимент 2, на верхнем графике показан эксперимент 1.

Фиг. 9. Блокирование PVRL2 приводит к значительному повышению клеточного лизиса клеток MV4-11. Совокупное действие можно наблюдать для комбинации AMG330 и PVRL2-Ab.

Фиг. 10. Блокирующие PVRL2 антитела усиливают уничтожение в анализах цитотоксичности (линия клеток Kasumi-1). Антитело к PVRL2 L-14 значительно усиливает уничтожение клеток через 24 ч. На нижнем графике показан эксперимент 1, на среднем графике показан эксперимент 3, на верхнем графике показан эксперимент 2.

Фиг. 11. Блокирование PVRL2 приводит к значительному повышению клеточного лизиса в клетках Kasumi-1. PVRL2-Ab оказывает сходное действие на лизис клеток по сравнению с обработкой AMG330 в одиночку. Совокупное действие можно наблюдать для комбинации AMG330 и PVRL2-Ab.

Фиг. 12. Блокирующие PVRL2 антитела усиливают уничтожение в анализах цитотоксичности (линия клеток UKE-1). Антитело к PVRL2 L-14 значительно усиливает уничтожение клеток через 24 ч. На нижнем графике показан эксперимент 2, на верхнем графике показан эксперимент 1.

Фиг. 13. Комбинация AMG330 и блокирующего PVRL2 антитела приводит к значительному повышению цитотоксичности в UKE-1.

Фиг. 14. Блокирование галектина-9 приводит к значительному повышению клеточного лизиса клеток MV4-11. Совокупное действие можно наблюдать для комбинации AMG330 и 9M1-3-Ab.

Фиг. 15. Блокирование галектина-9 приводит к значительному повышению клеточного лизиса клеток KG-1. Совокупное действие можно наблюдать для комбинации AMG330 и 9M1-3-Ab.

Фиг. 16. PVR и PVRL2 характеризуются высокой экспрессией на клеточных линиях ОМЛ и первичных бластных клетках ОМЛ CD33⁺. Экспрессия белков PVR и PVRL2, изображенная в виде процентного содержания позитивных в отношении CD33⁺ клеток, а также соотношение медианной интенсивно-

сти флуоресценции как показателя интенсивности экспрессии на линиях клеток ОМЛ (n=8; А, В) и бластных клетках ОМЛ CD33⁺ от не проходивших лечение пациентов (n=17; С, D). Черной черточкой представлено среднее значение.

Фиг. 17. Блокирование PVR и PVRL2 повышает лизис линий клеток ОМЛ. Опосредованный МКПК здоровых доноров (ЗД-МКПК) лизис линий клеток ОМЛ MV4-11 (А), TF-1 (В), Molm-13 (С), Kasumi-1 (D) измеряли через 24 ч. Результаты показаны в виде среднего $\pm$ СО для кратности изменения (КИ) числа мертвых клеток-мишеней, нормализованного относительно контроля без блокирующих антител. Для статистического анализа использовали U-критерий Манна-Уитни (# - $p \leq 0,05$; * - $p \leq 0,001$; $n \geq 3$).

Фиг. 18. Опосредованный Т-клетками лизис ViTE®-конструкции антитела AMG330 значительно повышается дополнительным введением блокирующих антител к PVR и PVRL2. Клетки MV4-11 (А), TF-1 (В), Molm-13 (С), Kasumi-1 (D) инкубировали с ЗД-МКПК и AMG 330 в присутствии или отсутствии блокирующих антител против PVR или PVRL2. Результаты показаны в виде среднего $\pm$ СО для кратности изменения (КИ) числа мертвых клеток-мишеней, нормализованного относительно контроля без блокирующих антител. Для статистического анализа использовали U-критерий Манна-Уитни (# - $p \leq 0,05$; * - $p \leq 0,001$; $n \geq 3$).

Фиг. 19. Повышение лизиса клеток путем блокирования PVR и PVRL2 является специфическим и не опосредуется АЗКЦ. А, В - чтобы определить вклад АЗКЦ, проводили сравнительный анализ противолейкозного действия Т-клеток CD3⁺ с МКПК от того же здорового донора с дополнительным введением AMG 330 или без него, используя линии клеток MV4-11 (А) и TF-1 (В). Результаты показаны в виде среднего $\pm$ СО числа мертвых клеток-мишеней (n=2). С, D - клетки Kasumi-1 инкубировали с возрастающими дозами антитела, нацеленного на CD117, в присутствии или отсутствии AMG 330 (n=2, + - 2 мкг/мл, ++ - 10 мкг/мл, +++ - 50 мкг/мл). Результаты показаны в виде среднего $\pm$ СО для кратности изменения (КИ) числа мертвых клеток-мишеней, нормализованного относительно контроля. Е, F - Fc-рецепторы на ЗД-МКПК насыщали поликлональными человеческими IgG и сравнивали с ненасыщенными ЗД-МКПК, применяя в качестве эффекторных клеток против клеток MV4-11. Результаты показаны в виде среднего $\pm$ СО числа мертвых клеток-мишеней (n=3).

Фиг. 20. Клетки с двойным нокаутом PVR и PVRL2 повторяют действие антитела *in vitro* и продлевают выживаемость мышей NSG с восстановленной человеческими Т-клетками Т-клеточной популяцией *in vivo*. А - используя CRISPR/Cas9, создавали поликлональную популяцию MV4-11, имеющую двойной нокаут PVR и PVRL2. Клетки MV4-11 дикого типа или с двойным нокаутом инкубировали с ЗД-МКПК в течение 24 ч с AMG 330 или без него. Для статистического анализа использовали U-критерий Манна-Уитни (# - $p \leq 0,05$; * - $p \leq 0,001$, n=3). В - иммунодефицитным мышам NSG трансплантировали клетки MV4-11 дикого типа (ДТ) или с двойным нокаутом PVR и PVRL2 (НК) и восстанавливали человеческими Т-клетками Т-клеточную популяцию. Обработка состояла из ежедневного внутрибрюшинного применения плацебо (n=13 для ДТ n=12 для НК) или 15 мкг/кг AMG 330 (n=12 для ДТ и n=15 для НК). Применяли логарифмический ранговый критерий: ДТ плацебо против НК плацебо $p < 0,001$; ДТ AMG 330 против НК AMG 330 $p < 0,001$; ДТ плацебо против ДТ AMG 330 $p = 0,003$; НК плацебо против НК AMG 330 $p = 0,027$. С - способность к пролиферации клеток с нокаутом, созданных с помощью CRISPR/Cas9. Скорость роста клеток MV4-11 с двойным нокаутом PVR и PVRL2 сравнивали со способностью к пролиферации клеток MV4-11 дикого типа. Число клеток определяли на 2 и 4 день, используя автоматическое устройство для подсчета клеток Vi-Cell™XR (Beckman Coulter); n=3.

Фиг. 21. Геномный анализ клеток с CRISPR/Cas9-опосредованным двойным нокаутом PVR и PVRL2. Чтобы подтвердить опосредованный CRISPR/Cas9 нокаут PVR и PVRL2 в клетках MV4-11 на геномном уровне, анализировали соответствующие генные участки нескольких одиночных клеток путем субклонирования и секвенирования. Представлены геномные изменения, включая влияние на белковую последовательность, для трех разных клонов с нокаутом, для PVR (А) и PVRL2 (В) соответственно. В верхней части приведена последовательность дикого типа с целевыми участками в синем цвете и последовательность ПАМ в зеленом цвете. В случае PVRL2 целевой участок и последовательность ПАМ находятся в обратнo-комплементарной ориентации, так как направляющая РНК PVRL2 распознавала антипараллельную нить ДНК. Удаления в пределах субклонов показаны красным пунктиром, а вставки показаны красным. ДТ - дикий тип, НК - двойной нокаут, ПАМ - мотив, прилегающий к протоспейсеру, АК - аминокислота.

Подробное описание изобретения

Следующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания изобретения. Это не означает признания того, что любая представленная в настоящем изобретении информация представляет собой предыдущий уровень техники или имеет отношение к заявляемому в настоящем изобретении, или что любая публикация, на которую приведена прямая или косвенная ссылка, составляет предыдущий уровень техники.

Настоящее изобретение, по меньшей мере, частично основано на неожиданном открытии, что ингибиторы контрольных точек иммунного ответа против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT можно эффективно использовать для лечения различных видов рака крови, в частности острого

миелоидного лейкоза (ОМЛ), имеющих механизмы уклонения от иммунологического надзора, тем самым обеспечивая новый и очень эффективный иммунотерапевтический подход к терапии рака. В этой связи авторы изобретения обнаружили в *in vitro* исследованиях с различными лейкозными линиями клеток, что лиганды контрольных точек иммунного ответа CD112 и CD155 и их рецептор TIGIT, лиганд контрольных точек иммунного ответа галектин-9 и его рецептор TIM-3 являются хорошо подходящими мишенями в применении фармацевтической композиции, содержащей такие ингибиторы, для лечения различных видов рака крови, в частности ОМЛ. CD112 и CD155 являются белковыми лигандами контрольных точек иммунного ответа, тогда как их рецептором является TIGIT. В качестве одного из аспектов раскрытия галектин-9 также является лигандом, а TIM-3 - его рецептором.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что наличие лигандов контрольных точек иммунного ответа PVR и PVRL2 и их рецептора TIGIT вероятно имеет негативное прогностическое последствие для общей выживаемости у пациентов с ОМЛ (данные не показаны). Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что блокирование PVR, PVRL2 или TIGIT приводит к значительному уничтожению клеток ОМЛ (фиг. 3-13). Соответственно авторы настоящего изобретения обратили внимание на PVR, PVRL2 и TIGIT как на новые мишени при лечении рака крови, в частности лечения ОМЛ, и предлагают вещества, которые эффективно ингибируют иммуноингибиторный сигнал PVR, PVRL2 и/или TIGIT, тем самым ингибируя раковую пролиферацию посредством механизма восстановления и активации иммунной функции Т-клеток. Кроме того, в данной области техники существуют противоречивые данные, описывающие позитивные, а также негативные прогностические последствия лиганда контрольных точек иммунного ответа галектина-9 и его рецептора TIM-3 для активности Т-клеток и развития опухоли. Хотя исследования экспрессии, по-видимому, подчеркнули, что галектин-9 и TIM-3 имеют скорее позитивные прогностические последствия для пациентов с раком (данные не показаны), в качестве одного из аспектов раскрытия было выявлено, что блокирование галектина-9 и TIM-3 приводит к значительному уничтожению клеток ОМЛ (смотрите фиг. 14 и 15).

Как показано авторами настоящего изобретения, все исследуемые линии клеток ОМЛ являются приблизительно на 100% позитивными в отношении экспрессии белков PVR и PVRL2. В отличие от них только 52 и 40% МКПК от здоровых доноров экспрессируют PVR и PVRL2 соответственно (фиг. 1). Кроме того, плотность белка для PVR и PVRL2 является очень высокой по сравнению с очень низкой плотностью на МКПК. Более того, экспрессия и плотность белка галектина-9 является низкой и сравнимой с МКПК от здоровых доноров. Также первичные бластные клетки пациентов с ОМЛ демонстрируют экспрессию PVR и PVRL2. В связи с этим МНК пациентов с впервые диагностированным ОМЛ выделяли и одновременно окрашивали в отношении CD33 и PVR или PVRL2 соответственно. На графике изображена процентная доля позитивных в отношении PVR или PVRL2 клеток в пределах популяции CD33 (фиг. 2).

Как раскрыто в настоящем изобретении, взаимодействие PVR и PVRL2 с их рецептором TIGIT, а также в качестве одного из аспектов раскрытия галектина-9 с его рецептором TIM-3 действует как иммуносупрессивный или даже иммуноингибиторный сигнал и, таким образом, служит механизмом уклонения от иммунологического надзора при ОМЛ. В соответствии с вышесказанным предполагается, что ингибиторы контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению против CD112, CD155 и/или TIGIT должны ингибировать или затруднять взаимодействие между CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT, тем самым стимулируя специфический к раку иммунный ответ. Аналогично, предполагается, что ингибиторы контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению против CD155 ингибируют взаимодействие между CD155 и TIGIT или затрудняют взаимодействие между CD155 и TIGIT. Также предполагается, что ингибиторы контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению против TIGIT ингибируют взаимодействие между TIGIT и CD112 и/или CD155 или затрудняют взаимодействие между TIGIT и CD112 и/или CD155. Кроме того, в качестве одного из аспектов раскрытия предполагается, что ингибиторы контрольных точек иммунного ответа против галектина-9 ингибируют взаимодействие между галектином-9 и TIM-3 или затрудняют взаимодействие между галектином-9 и TIM-3. Аналогично, в качестве одного из аспектов раскрытия предполагается, что ингибиторы контрольных точек иммунного ответа против TIM-3 ингибируют взаимодействие между TIM-3 и галектином-9 или затрудняют взаимодействие между TIM-3 и галектином-9.

В контексте настоящего изобретения термин "ингибировать" или "ингибирование" относится к способности ингибиторов согласно настоящему изобретению блокировать, частично блокировать, препятствовать, снижать, подавлять, уменьшать или дезактивировать белок-мишень, т.е. лиганды контрольных точек иммунного ответа CD112 и CD155 и/или их рецептор TIGIT, лиганд контрольных точек иммунного ответа галектин-9 и/или его рецептор TIM-3. Таким образом, специалисту в данной области техники понятно, что термин "ингибировать" может включать полную и/или частичную потерю активности указанным лигандом или рецептором. Активность указанного лиганда или рецептора может подавляться или ингибироваться соединением, связывающимся с активным участком белка лиганда/рецептора или другими способами, например путем деактивации второго белка, который активирует ингибируемый первый белок. Например, на полное и/или частичное ингибирование взаимодействия между CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT а также галектином-9 и TIM-3 может указывать значительное повышение лизиса клеток,

т.е. значительное повышение скорости гибели клеток-мишеней рака крови, в частности клеток-мишеней ОМЛ.

В контексте настоящего изобретения термин "рак крови" включает, в частности, лейкоз и лимфому, например ходжкинскую лимфому или неходжкинскую лимфому. Также он включает миелодиспластический синдром (МС) и множественную миелому (ММ).

"Острый миелоидный лейкоз", также называемый острым миелоцитарным лейкозом, острым миелогенным лейкозом, острым гранулоцитарным лейкозом, острым нелимфоцитарным лейкозом или просто "ОМЛ", в общем случае относится к острой форме лейкоза, которая, как правило, характеризуется сверхвыработкой и/или накоплением раковых, незрелых миелобластов, эритроцитов или тромбоцитов в костном мозге. "Острый" означает, что лейкоз может быстро прогрессировать при отсутствии лечения и с большой вероятностью приведет к смертельному исходу через несколько месяцев. "Миелоидный" относится к типу клеток, с которых начинается данный лейкоз. Большинство случаев ОМЛ развиваются из клеток, которые должны были превратиться в белые кровяные тельца (отличные от лимфоцитов), однако существуют другие подтипы ОМЛ. ОМЛ начинается в костном мозге, но в большинстве случаев быстро перемещается в кровь. В контексте настоящего изобретения термин "ОМЛ" включает острый, рефрактерный и рецидивный ОМЛ. В контексте настоящего изобретения термин "рефрактерный ОМЛ" означает резистентность ОМЛ к традиционной или стандартной терапии ОМЛ, такой как химиотерапия или трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), т.е. традиционная или стандартная терапия ОМЛ не способна в конечном итоге вылечить всех пациентов с ОМЛ. В контексте настоящего изобретения термин "рецидивный ОМЛ" указывает на возвращение признаков и симптомов заболевания ОМЛ после периода ремиссии у пациента. Например, после традиционного лечения ОМЛ с помощью химиотерапии и/или ТГСК у пациента с ОМЛ может наступить ремиссия с отсутствием признаков или симптомов ОМЛ, ремиссия может продолжаться несколько лет, но потом наступает рецидив и пациента снова нужно лечить от ОМЛ. В контексте настоящего изобретения термин "ОМЛ" также включает минимальное остаточное заболевание (МОЗ) у пациентов с ОМЛ, т.е. наличие небольших количеств раковых миелоидных клеток, остающихся в организме пациента во время лечения или после лечения, когда пациент находится на стадии ремиссии.

В контексте настоящего изобретения термин "ингибитор контрольных точек иммунного ответа" относится к любому связывающему агенту или соединению, подходящему для противодействия белкам контрольных точек иммунного ответа CD112, CD155, TIGIT, галектину-9 и/или TIM-3, и таким образом, для ингибирования или подавления иммуноингибиторного сигнала взаимодействия между CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT и/или галектином-9 и TIM-3. В контексте настоящего изобретения термин "иммуноингибиторный сигнал" относится к взаимодействию между лигандами и рецепторами контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению и снижению, таким образом, иммунной активности вовлеченной Т-клетки против вовлеченной опухолевой клетки и обеспечению возможности для опухолевой клетки уклоняться от механизмов иммунной защиты организма. Следовательно, ингибиторы согласно настоящему изобретению, направленные против CD112, CD155 и/или TIGIT, ингибируют этот иммуноингибиторный сигнал между лигандами и рецепторами контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению, обеспечивая таким образом возможность Т-клеткам атаковать и уничтожать вовлеченные опухолевые клетки. Соответственно ингибиторы согласно настоящему изобретению способны снижать или ингибировать иммуноингибиторный сигнал между лигандом контрольной точки иммунного ответа и его рецептором согласно настоящему изобретению. Соответственно ингибиторы согласно настоящему изобретению проявляют "иммуностимулирующую" активность путем активации Т-клеточного ответа против раковых клеток. В частности, ингибитор согласно настоящему изобретению, характеризующийся иммуностимулирующей активностью, способен снижать или ингибировать интенсивность иммуноингибиторного сигнала между CD112 и TIGIT. Дополнительно предусматривается, что ингибитор, характеризующийся иммуностимулирующей активностью согласно настоящему изобретению, способен снижать или ингибировать интенсивность иммуноингибиторного сигнала между CD155 и TIGIT. Дополнительно, в качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибитор, характеризующийся иммуностимулирующей активностью, способен снижать или ингибировать интенсивность иммуноингибиторного сигнала между галектином-9 и TIM-3.

В соответствии с настоящим изобретением связывание ингибитора иммунной контрольной точки согласно настоящему изобретению против соответствующего белка-мишени контрольной точки иммунного ответа модулирует внутриклеточную сигнализацию указанного белка-мишени. Таким образом, предусматривается, что ингибитор против CD112 модулирует внутриклеточную сигнализацию CD112. Аналогично, одним из аспектов раскрытия является то, что ингибитор против CD155 модулирует внутриклеточную сигнализацию CD155. Аналогично, одним из аспектов раскрытия является то, что ингибитор против TIGIT модулирует внутриклеточную сигнализацию TIGIT. Аналогично, предусматривается, что ингибитор против галектин-9 модулирует внутриклеточную сигнализацию галектина-9. Аналогично, предусматривается, что ингибитор против TIM-3 модулирует внутриклеточную сигнализацию TIM-3. В контексте настоящего изобретения термин "модулировать" или "модуляция" включает повышение, снижение или какое-либо другое изменение внутриклеточного сигнала белков контрольных точек иммунно-

го ответа согласно настоящему изобретению, т.е. CD112, CD155 и/или TIGIT. В связи с этим внутриклеточный сигнальный путь, связанный с этими белками контрольных точек иммунного ответа, может быть усилен, затруднен или полностью предотвращен, что, таким образом, изменяет уровень, количество и/или активность последующих сигнальных элементов, включая клеточную активацию, пролиферацию и злокачественный рост.

Как раскрыто в настоящем изобретении, ингибиторы против CD112, CD155 и/или TIGIT согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака крови, в частности острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Различные виды рака крови представляют собой различные виды рака кровяных клеток, которые появляются в костном мозге и, как правило, включают лейкоз и лимфому. В случае рака крови костный мозг начинает вырабатывать аномальные клетки, которые вытесняют нормальные клетки крови. Аналогично, раскрытые в настоящем изобретении ингибиторы исключительно полезны для лечения любого типа рака крови, характеризуемого повышенной экспрессией CD112 и/или CD155 в опухолевых клетках. В частности, раскрытые в настоящем изобретении ингибиторы в особенности полезны для лечения любого типа рака крови. Соответственно в качестве одного из аспектов раскрытия предусматривается, что ингибиторы согласно настоящему изобретению также могут быть предназначены для применения в лечении других видов рака крови, характеризуемых повышенной экспрессией CD112 и/или CD155 в опухолевых клетках, таких как хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), миелодиспластический синдром (МС или миелодисплазия) и миелопролиферативные новообразования (МПН). Дополнительно предусматривается, что ингибиторы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения твердых опухолей, характеризуемых повышенной экспрессией CD112, CD155 и/или галектина-9. В этой связи раскрытые в настоящем изобретении ингибиторы можно использовать для взаимодействия между лигандами контрольных точек иммунного ответа CD112 и/или CD155, экспрессируемыми в опухолевых клетках, и их рецепторами контрольных точек иммунного ответа TIGIT, экспрессируемыми в Т-клетках, как описано в другом месте настоящего описания.

Как продемонстрировано в настоящем изобретении с помощью анализа FACS и *in vitro* анализа цитотоксичности для различных лейкозных клеточных линий, антитела против PVR и PVRL2 хорошо подходят для блокирования этих лигандов контрольных точек иммунного ответа, повышая, таким образом, клеточный лизис клеток ОМЛ (фиг. 3-13). Соответственно предпочтительно, чтобы ингибитор согласно настоящему изобретению представлял собой конструкцию антитела. Термин "конструкция антитела" в контексте настоящего изобретения означает "связывающую молекулу" или "связывающий агент" на основе антитела, который способен (специфически) связывать, взаимодействовать или распознавать молекулы контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению. Конструкция антитела может связываться/взаимодействовать с поверхностной молекулой раковой клетки-мишени ОМЛ или рецепторным комплексом на Т-клетке. Предпочтительной связывающей молекулой является антитело.

Термин "антитело" относится к молекуле, чья структура и/или функция основаны на структуре и/или функции антитела, например полноразмерной или цельной молекуле иммуноглобулина. В соответствии с настоящим изобретением антитело для применения в лечении рака крови, в частности ОМЛ, представляет собой ингибиторное антитело, которое специфически ингибирует взаимодействие между лигандом контрольной точки иммунного ответа и рецептором контрольной точки иммунного ответа согласно настоящему изобретению. В этой связи предусматривается, что раскрытое в настоящем изобретении антитело специфически ингибирует взаимодействие между CD112 и TIGIT. Также предусматривается, что раскрытое в настоящем изобретении антитело специфически ингибирует взаимодействие между CD155 и TIGIT. В частности, при ингибировании взаимодействия между лигандом контрольной точки иммунного ответа и рецептором контрольной точки иммунного ответа согласно настоящему изобретению антитело согласно настоящему изобретению ингибирует иммуоингибиторное взаимодействие между CD112/TIGIT и/или CD55/TIGIT, тем самым ингибируя сигнал взаимодействия лиганд-рецептор. Таким образом, раскрытое в настоящем изобретении антитело связывается с лигандами или рецепторами контрольных точек иммунного ответа согласно настоящему изобретению и затрудняет, если не делает невозможным, прохождение иммуоингибиторного сигнала между указанными лигандами и рецепторами. В соответствии с вышесказанным типовые антитела, применимые в способах и применениях согласно настоящему изобретению, включают анти-CD112 антитела, анти-CD155 антитела и анти-TIGIT антитела. Специалисту в данной области техники известно об огромном количестве различных ингибиторных антител, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, ингибируя, таким образом, взаимодействие между лигандами и рецепторами контрольных точек иммунного ответа, как раскрыто в другом месте настоящего описания.

Определение термина "антитело" включает варианты осуществления, такие как моноклональные, химерные, одноцепочечные, гуманизированные и человеческие антитела, а также фрагменты антител, такие как, помимо прочего, фрагменты Fab. Фрагменты или производные антител дополнительно включают фрагменты F(ab')₂, Fv, scFv или однодоменные антитела, такие как доменные антитела или нанотела, содержащие одиночный вариабельный домен антитела или одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, содержащий только один вариабельный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, который специфически связывает антиген или эпитоп независимо от других V-областей или

доменов; смотрите, например, Harlow and Lane (1988) и (1999), loc. cit.; Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009. Такой одиночный вариабельный домен иммуноглобулина включает не только выделенный полипептид одиночного вариабельного домена антитела, но также более крупные полипептиды, которые содержат один или более мономеров последовательности полипептида одиночного вариабельного домена антитела. Моновалентные фрагменты антител наряду с вышеуказанным определением описывают вариант осуществления связывающего домена в связи с этим изобретением. Такие моновалентные фрагменты антител связываются со специфическим антигеном и также могут называться "антигенсвязывающим доменом", "антигенсвязывающим фрагментом" или "связывающей областью антитела".

Наряду с этим определением, приведенным в настоящем изобретении, термин "антитело" может относиться к термину "конструкция антитела". Указанный термин также включает диатела или антитела с двойной аффинностью (DART). Дополнительно предусматриваются (биспецифические) одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab), "мини-тела", примеры которых имеют следующую структуру: $(VH-VL-CH_3)_2$, $(scFv-CH_3)_2$ или $(scFv-CH_3-scFv)_2$, антитела "Fc DART" и антитела "IgG DART", а также мультитела, такие как триатела. Одиночные вариабельные домены иммуноглобулина включают не только выделенный полипептид одиночного вариабельного домена антитела, но также более крупные полипептиды, которые содержат один или более мономеров последовательности полипептида одиночного вариабельного домена антитела.

В данной области техники известны различные процедуры, которые можно применять для получения таких конструкций антител (антител и/или фрагментов). Таким образом, производные (антител) можно получить с помощью пептидомиметиков. Кроме того, методы, описанные для получения одноцепочечных антител (смотрите, помимо прочего, патент США 4946778, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.), можно адаптировать для получения одноцепочечных антител, специфических в отношении выбранного(ых) полипептида(ов). Также можно использовать трансгенных животных для экспрессии гуманизированных антител, специфических в отношении полипептидов и гибридных белков согласно данному изобретению. Для получения моноклональных антител можно использовать любой способ, обеспечивающий получение антител, вырабатываемых непрерывными культурами клеточных линий. Примеры таких способов включают метод гибридомы (Köhler and Milstein *Nature* 256 (1975), 495-497), метод триомы, метод человеческой В-клеточной гибридомы (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) и метод ЭБВ-гибридомы для получения человеческих моноклональных антител (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Метод поверхностного плазмонного резонанса, применяемый в системе BIAcore, можно использовать для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с эпитопом полипептида-мишени, такого как CD3 эпсилон (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). Также в контексте данного изобретения предусматривается, что термин "антитело" включает конструкции антител, которые могут экспрессироваться в организме-хозяине, как описано ниже, например конструкции антител, которые могут быть трансфицированы и/или трансдуцированы посредством, помимо прочего, вирусом или плазмидных векторов.

Кроме того, употребляемый в настоящем изобретении термин "антитело" также относится к производным или вариантам описанных в настоящем изобретении антител, которые демонстрируют такую же специфичность, что и описанные антитела. Примеры "вариантов антител" включают гуманизированные варианты нечеловеческих антител, "аффинно созревшие" антитела (смотрите, например, Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832- 10837 (1991)) и мутантные антитела с измененной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями) (смотрите, например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.).

В контексте настоящего изобретения термины "антигенсвязывающий домен", "антигенсвязывающий фрагмент" и "связывающая область антитела" относятся к части молекулы антитела, которая содержит аминокислоты, отвечающие за специфическое связывание между антителом и антигеном. Часть антигена, которая специфически распознается и связывается антителом, называется "эпитопом", как описано выше. Как указано выше, антигенсвязывающий домен, как правило, может содержать вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH); однако он не обязательно должен содержать их обе. Fd-фрагменты, например, имеют две VH-области и часто сохраняют некоторые антигенсвязывающие функции интактного антигенсвязывающего домена. Примеры антигенсвязывающих фрагментов антитела включают (1) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, содержащий домены VL, VH, CL и CH1; (2) фрагмент $F(ab')_2$, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, содержащий два домена VH и CH1; (4) фрагмент Fv, содержащий домены VL и VH одного плеча антитела, (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который содержит домен VH; (6) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) и (7) одноцепочечный Fv (scFv). Хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить, используя рекомбинантные способы, синтетическим линкером, который обеспечивает возможность получения их в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одно-

цепочечные Fv (scFv); смотрите, например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают, используя традиционные методы, известные специалистам в данной области техники, и оценивают эти фрагменты в отношении функции таким же образом, что и интактные антитела.

В случае использования (синтетического) линкера этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточные, чтобы гарантировать, что каждый из первого и второго доменов может, независимо от другого, сохранять свою дифференциальную специфичность связывания. Наиболее предпочтительно и как указано в прилагаемых примерах конструкция антитела согласно изобретению представляет собой "конструкцию биспецифического одноцепочечного антитела", наиболее предпочтительно биспецифический одноцепочечный Fv (scFv). Биспецифические одноцепочечные молекулы известны в данной области техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Одним примером нацеленного на CD33 соединения в связи с настоящим изобретением, которое является биспецифической одноцепочечной молекулой, является AMG330, которое также используется в прилагаемых примерах. Последовательность AMG330 была изначально описана в WO 2008/119567. Указанные вариabельные домены, содержащиеся в описанных в настоящем изобретении конструкциях антител, могут быть связаны дополнительными линкерными последовательностями. Термин "пептидный линкер" определяет в соответствии с настоящим изобретением аминокислотную последовательность, посредством которой аминокислотные последовательности первого домена и второго домена конструкции антитела согласно изобретению связаны друг с другом. Важным техническим признаком такого пептидного линкера является то, что указанный пептидный линкер не характеризуется какой-либо полимеризационной активностью. Предпочтительные аминокислотные остатки для пептидного линкера включают Gly, Ser и Thr, а сами линкеры характеризуются длиной от 5 до 25 аминокислотных остатков. К подходящим пептидным линкерам относятся описанные в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Предпочтительный вариант осуществления пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID No: 9) или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x - целое число, равное 1 или больше (например, 2 или 3). Также предпочтительными являются вариации этой линкерной последовательности, которая включает в себя примеры, такие как (Gly-Gly-Gly-Gly)_x (SEQ ID No: 10), (Gly-Gly-Gly-Gly-Gln)_x (SEQ ID No: 11), (Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_x (SEQ ID No: 12), (Pro-Gly-Gly-Asp-Gly-Ser)_x (SEQ ID No: 13) и (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_x (SEQ ID No: 14). Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие способствования образованию вторичных структур, известны в данной области техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые также не способствуют образованию каких-либо вторичных структур. Связывание указанных доменов друг с другом может быть обеспечено, например, посредством генетически инженерии, как описано в примерах. Способы получения гибридных и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и их экспрессии в клетках млекопитающих или бактерий хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

В случае пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена в конструкции антитела согласно изобретению, предпочтительными являются пептидные линкеры, которые содержат только небольшое количество аминокислотных остатков, например 12 аминокислотных остатков или менее. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Предусматриваемый пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, при этом предпочтительными являются Gly-богатые линкеры. Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте указанного "пептидного линкера" является Gly. Соответственно указанный пептидный линкер может состоять из единственной аминокислоты Gly.

В контексте настоящего изобретения термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из популяции в значительной степени гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных мутаций природного происхождения и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и нацелены на один антигенный участок. Кроме того, в противоположность традиционным препаратам (поликлональных) антител, которые, как правило, содержат разные антитела, нацеленные на разные антигенные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело нацелено на одну детерминанту на антигене. Кроме их специфичности, преимущество моноклональных антител состоит в том, что их синтезируют с применением гибридомной культуры, не загрязненной другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела как получаемого из в значительной степени гомогенной популяции антител и не должно восприниматься как требование к по-

лучению антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением можно получать методом гибридомы, впервые описанным Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или можно получать любыми методами рекомбинантных ДНК (смотрите, например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также можно выделять из фаговых библиотек антител, используя методы, описанные, например, в Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные области, в значительной степени соответствующие последовательностям иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии, известным в данной области техники, например, тем, которые описаны Kabat et al. (смотрите Kabat et al. (1991) loc. cit.). Человеческие антитела согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, внесенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и, в частности, в CDR3. Человеческое антитело может содержать по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или более позиций, замещенных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Подчеркивается, что определение человеческих антител в контексте настоящего изобретения также подразумевает полностью человеческие антитела, которые содержат только человеческие последовательности антител, не измененные искусственно и/или генетически, так как они могут быть получены с применением технологий с использованием систем, таких как Xenomice.

Примеры "вариантов антител" включают гуманизированные варианты нечеловеческих антител, антитела "аффинно созревшие" антитела (смотрите, например, Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832- 10837 (1991)) и мутантные антитела с измененной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями) (смотрите, например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little(2009), loc. cit.). В контексте настоящего изобретения "in vitro созданное антитело" относится к антителу, в котором вся или часть переменной области (например, по меньшей мере одна CDR) создана методом неиммунного клеточного отбора (например, *in vitro* фагового дисплея, белкового чипа или любого другого метода, в котором кандидатные последовательности можно исследовать в отношении их способности связываться с антигеном). Таким образом, этот термин предпочтительно исключает последовательности, созданные методом геномной перестройки в иммунной клетке. Спаривание вместе VH и VL приводит к образованию одного антигенсвязывающего участка. Домен CH, расположенный наиболее близко к VH, обозначают как CH1. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Домены VH и VL состоят из четырех областей с относительно консервативными последовательностями, называемых каркасными областями (FR1, FR2, FR3 и FR4), которые образуют каркас для трех областей гиперпеременных последовательностей (определяющих комплементарность областей, CDR). CDR содержат большинство остатков, которые отвечают за специфические взаимодействия антитела с антигеном. CDR называются CDR1, CDR2, и CDR3. Соответственно составляющие CDR в тяжелой цепи называются H1, H2 и H3, тогда как составляющие CDR в легкой цепи называются L1, L2 и L3.

Термин "переменные" относится к частям доменов иммуноглобулинов, которые проявляют переменность в своей последовательности и которые вовлечены в определение специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. "переменный(е) домен(ы)"). Переменность не распределена равномерно по переменным доменам антител; она сконцентрирована в субдоменах каждой из переменных областей тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гиперпеременными" областями или "определяющими комплементарность областями" (CDR). Более консервативные (т.е. не гиперпеременные) части переменных доменов называются "каркасными" областями (FRM). Переменные домены тяжелых и легких цепей природного происхождения содержат четыре FRM-области, преимущественно принимающие β -складчатую конфигурацию, соединенные тремя гиперпеременными областями, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть β -складчатой структуры. Гиперпеременные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости FRM и вместе с гиперпеременными областями другой цепи отвечают за образование антигенсвязывающего участка (смотрите Kabat et al., loc. cit.). Константные домены напрямую не вовлечены в связывание антигена, но проявляют различные эффекторные функции, такие как, например, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность и активация комплемента.

Термин "CDR", а также его форма множественного числа, относится к определяющим комплементарность областям (CDR), три из которых определяют связывающие характеристики переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), а три определяют связывающие характеристики переменной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3). CDR вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела и разделены аминокислотными последовательностями, которые составляют поддерживающие или каркасные области. Точное определение границ и длины CDR является предметом разных классификаций и систем нумерации. Следовательно, CDR могут называться по определению Ка-

bat, Chothia, контактными или любым другим граничным определением, включая описанную в настоящем изобретении систему нумерации. Несмотря на разные границы, каждая из этих систем характеризуется некоторой степенью перекрытия в отношении так называемых "гипервариабельных областей" в пределах вариабельных последовательностей. Следовательно, определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным областям в отношении прилегающей каркасной области. Смотрите, например, Kabat, Chothia и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; и MacCallum et al., J. Mol. Biol., 1996, 262: 732). При этом предпочтительной является нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat. CDR3 легкой цепи и, в частности, CDR3 тяжелой цепи могут составлять наиболее важные детерминанты в связывании антигена в пределах вариабельных областей легкой и тяжелой цепей. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи составляет основную площадь контакта между антигеном и антителом. In vitro схемы отбора, в которых варьирует только CDR3, можно использовать для изменения связывающих свойств антитела или определения, какие остатки вносят вклад в связывание антигена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем изобретении связывающие молекулы представляют собой выделенные белки или в значительной степени очищенные белки. "Выделенный" белок не сопровождается, по меньшей мере, некоторым количеством материала, с которым он обычно связан в своем природном состоянии, например, составляя по меньшей мере около 5 мас.% или по меньшей мере около 50 мас.% от общего белка в заданном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Например, белок можно получить в значительно большей концентрации посредством применения индуцибельного промотора или промотора высокого уровня экспрессии так, чтобы получить белок с повышенными уровнями концентрации. Данное определение включает получение антигенсвязывающего белка в разнообразных организмах и/или клетках-хозяевах, которые известны в данной области техники.

Как раскрыто в настоящем изобретении, экспериментальные результаты настоящего изобретения четко демонстрируют ингибиторное действие антител, нацеленных на контрольные точки иммунного ответа CD112, CD155 и TIGIT, и в качестве одного из аспектов раскрытия галектин-9 и TIM-3. При этом любое другое вещество, которое может ингибировать иммуноингибиторный сигнал между CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT и/или галектином-9 и TIM-3, будет иметь сходное действие. Вещества с таким действием включают, например растворимый CD112, растворимый CD155, растворимый TIGIT, растворимый галектин-9, растворимый TIM-3, антагонистов CD112, антагонистов CD155, антагонистов TIGIT, антагонистов галектина-9, антагонистов TIM-3, вещества, которые ингибируют взаимодействие между CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT и/или галектином-9 и TIM-3, ингибиторов выработки CD112, ингибиторов выработки CD155, ингибиторов выработки TIGIT, ингибиторов выработки TIGIT, ингибиторов выработки TIM-3 и ингибиторов внутриклеточных ингибиторных сигналов TIGIT или TIM-3.

Соответственно ингибиторы CD112, CD155 и/или TIGIT согласно настоящему изобретению включают белковые или небелковые соединения или агенты. В связи с этим белки и полипептиды или производные, которые связываются с CD112, CD155 и/или TIGIT, включают любые частичные белки CD112, CD155 и/или TIGIT, иммуноингибиторный сигнал которых между CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT и/или галектином-9 и TIM-3 не индуцируется. Присутствие TIGIT или TIM-3 вблизи рецепторов контрольных точек иммунного ответа является обязательным для индукции иммуноингибиторного сигнала TIGIT или TIM-3, с этой целью оно ограничивается взаимодействием с CD112, CD155 (TIGIT) или галектином-9 (TIM-3) в опухолях или клетках карциномы. Следовательно, растворимый CD112, CD155 или галектин-9 с частью, которая представляет только внеклеточные домены и взаимодействует с TIGIT или TIM-3, может ингибировать иммуноингибиторный сигнал CD112, CD155 или галектина-9. С другой стороны, растворимый TIGIT или TIM-3 с частью, которая имеет сходную структуру и может взаимодействовать с CD112, CD155 или галектином-9, может ингибировать иммуноингибиторный сигнал. Эти растворимые белки должны содержать только внеклеточную область, которая является необходимой и достаточной для связывания с CD112, CD155, TIGIT, галектином-9 или TIM-3, и могут быть получены с помощью хорошо известных методов экспрессии и очистки.

Если ингибитор взаимодействия CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 или TIM-3 представляет собой белок или полипептид, а важная для взаимодействия область образована только полипептидом, и важная для взаимодействия область образована только последовательным полипептидом, такой полипептидный фрагмент может стать взаимным антагонистом. Кроме того, антагониста с более сильной активностью можно идентифицировать из молекулярных групп, из которых этот полипептидный фрагмент химически модифицирован, или спроектирован на компьютере на основании пространственной структуры полипептидного фрагмента. Также наилучшего антагониста можно более эффективно выбрать из молекулярных групп, спроектированных на компьютере на основании данных стереоанализа белка для области взаимодействия.

Дополнительно предусматривается, что ингибитор в фармацевтической композиции, используемой для лечения рака крови, в частности ОМЛ, как описано в настоящем изобретении, является низкомолекулярным ингибитором. Термин "низкомолекулярный" означает молекулу с низкой молекулярной массой, как правило, менее 1000 Да. В контексте настоящего изобретения такая небольшая молекула отно-

сится к полезным агентам, имеющим низкую молекулярную массу, которые обычно синтезируются методами органической химии, но также могут быть выделены из природных источников, таких как растения, грибы и микробы. При использовании в лечении различных видов рака крови в пределах объема настоящего изобретения такие небольшие молекулы также называются низкомолекулярными лекарственными препаратами. Обычные пути доставки низкомолекулярных лекарственных препаратов включают пероральный, инъекционный, ингаляционный и трансдермальный.

Дополнительно предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению против CD112 снижает экспрессию CD112. Аналогично, ингибитор согласно настоящему изобретению против CD155 снижает экспрессию CD155. Аналогично, ингибитор согласно настоящему изобретению против TIGIT снижает экспрессию TIGIT. Как раскрыто в настоящем изобретении, ингибитор согласно настоящему изобретению против галектина-9 снижает экспрессию галектина-9. Как раскрыто в настоящем изобретении, ингибитор согласно настоящему изобретению против TIM-3 снижает экспрессию TIM-3. Соответственно в настоящем изобретении дополнительно раскрыто применение нуклеотидной последовательности (например, терапевтической молекулы нуклеиновой кислоты, например, антисмыслового олигонуклеотида, кодирующей ее ДНК или вырабатывающего ее вектора) для получения антисмысловой молекулы, подходящей для снижения экспрессии гена-мишени, например генов, кодирующих CD112, CD155 и TIGIT, или, как раскрыто в настоящем изобретении, галектин-9 и TIM-3. В контексте настоящего изобретения термин "снижать экспрессию" относится к способности ингибитора согласно настоящему изобретению снижать или блокировать экспрессию гена-мишени, например генов, кодирующих CD112, CD155, TIGIT, галектин-9 и TIM-3 специфическим и посттранскрипционным образом. В этой связи настоящее изобретение относится к нуклеотидам, способным снижать экспрессию CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 в раковых клетках. Указанные нуклеотиды могут характеризоваться последовательностью, которая нацелена на мРНК и имеет по меньшей мере 50% идентичности последовательности, или по меньшей мере 70% идентичности последовательности, или по меньшей мере 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с целевой мРНК. Особенно полезными для этой цели являются последовательности РНК, которые можно использовать для получения нуклеотидного ингибитора. Было показано, что двойные спирали РНК из 21-23 нуклеотидов с ~2 выступающими 3' нуклеотидами (называемые малыми интерферирующими РНК или миРНК) опосредуют специфическое в отношении последовательности ингибирование генной экспрессии в клетках млекопитающих посредством механизма посттранскрипционной супрессии генов (ПТСГ), называемой РНК-интерференцией (РНКи). Соответственно РНКи считается одной из наиболее перспективных новых терапевтических стратегий на основании супрессии связанных с заболеванием генов *in vivo*. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеотид, способный снижать экспрессию CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3, представляет собой РНКи (иРНК). Специалисту в данной области техники известно несколько методов синтеза РНКи и доставки этих конструкций в опухолевые клетки *in vivo*, в том числе применяя, например, липосомальные составы, как описано, например, в Santel et al. 2006, Gene Therapy 13, 1360-1370. В этой связи сначала синтезируют двухцепочечную РНК с последовательностью, комплементарной представляющему интерес гену, и вносят в клетку или организм, где она распознается как экзогенный генетический материал и активирует путь РНКи. Так как РНКи может неполностью прекращать экспрессию гена, иногда этот метод называют "генным нокаутом", чтобы отличать его от процедур генного нокаута ("http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_knockout"), в которых полностью элиминируется экспрессия гена.

Соответственно дополнительно предусматривается, что ингибитор согласно настоящему изобретению, снижающий экспрессию CD112, CD155 и/или TIGIT, приводит к нокауту CD112, CD155 и/или TIGIT. В контексте настоящего изобретения термин "нокаут" относится к полному прекращению экспрессии по меньшей мере части полипептида, кодируемой эндогенным геном, кодирующим CD112, CD155 и/или TIGIT одной клетки, выбранных клеток или всех клеток млекопитающего, по сравнению с животным дикого типа. Млекопитающее может иметь "гетерозиготный нокаут", при котором был разрушен один аллель эндогенного гена. В альтернативном варианте млекопитающее может иметь "гомозиготный нокаут", при котором были разрушены оба аллеля эндогенного гена. Также предусматривается наличие "нокаута" более чем одного гена, кодирующего CD112, CD155 и/или TIGIT, предпочтительно двух генов. В этом случае млекопитающее называется млекопитающим "с двойным нокаутом". В соответствии с настоящим изобретением его авторы продемонстрировали возможность осуществления одиночного или двойного нокаута PVR и PVRL2 в линиях клеток ОМЛ при применении технологии CRISPR/Cas9. Соответственно настоящее изобретение также относится к ингибитору против CD112, CD155 и/или TIGIT, который приводит к нокауту CD112, CD155 и/или TIGIT, причем указанный нокаут осуществляют с помощью технологии CRISPR/cas9. При этом специалисту в данной области техники известны различные технологии, применяемые для осуществления нокаута контрольных точек иммунного ответа в клетке рака крови, в частности в клетках ОМЛ. Следовательно, технологии осуществления нокаута, входящие в объем настоящего изобретения, включают любые технологии для изменения генной последовательности, которые приводят к инактивации гена, или такие, при которых возможна инактивация экспрессии в выбранный момент во время развития, что приводит к потере функциональности гена.

Ингибитор контрольных точек иммунного ответа, раскрытый в настоящем изобретении, может дополнительно включать Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR). CAR Т-клетки содержат сконструированные рецепторы (химерные антигенные рецепторы), которые прививают Т-клетке специфичность моноклонального антитела, при этом перенос кодирующей их последовательности облегчается ретровирусными векторами. Эти CAR позволяют Т-клетке распознавать специфический белок (антиген) на опухолевых клетках. В соответствии с настоящим изобретением CAR Т-клетка предпочтительно содержит CAR, которые позволяют Т-клетке распознавать специфические белки на клетках рака крови. Предпочтительно CAR Т-клетка согласно настоящему изобретению способна распознавать CD33 на поверхности клеток рака крови, в частности на клетках ОМЛ. В этой связи добавление CAR Т-клеток, нацеленных на специфическую поверхностную молекулу, экспрессируемую клетками рака крови, такую как CD33, может повысить цитотоксическое действие ингибиторов против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3. Соответственно предусматривается, что ингибиторы согласно настоящему изобретению против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 содержат CAR Т-клетку. Указанная CAR Т-клетка предпочтительно содержит связывающий домен, нацеленный на поверхностную молекулу, экспрессируемую клетками рака крови, в частности клетками ОМЛ. Указанная поверхностная молекула предпочтительно представляет собой CD33, CD19 или Flt3. Соответственно ингибитор согласно настоящему изобретению может содержать CAR Т-клетку, имеющую связывающий домен, нацеленный на CD33. Ингибитор согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать CAR Т-клетку, имеющую связывающий домен, нацеленный на CD19. Ингибитор согласно настоящему изобретению также может содержать CAR Т-клетку, имеющую связывающий домен, нацеленный на Flt3. Специалисту в данной области техники известны различные технологии для получения CAR Т-клеток так называемого первого, второго и третьего поколений, направленных против указанных поверхностных молекул.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в другом месте настоящего описания ингибитор может дополнительно содержать конструкцию антитела, привлекающую Т-клетки. Такие конструкции антител, привлекающие Т-клетки, предпочтительно представляют собой биспецифические конструкции, привлекающие Т-клетки (конструкции антител BiTE), т.е. биспецифические антитела, которые связываются с Т-клеточным антигеном и опухолевым антигеном. Было показано, что конструкции антител BiTE индуцируют направленный лизис опухолевых клеток-мишеней и, таким образом, также представляют потенциальные варианты терапии различных видов рака и других нарушений. Одним из возможных подходов является привлекающая Т-клетки биспецифическая конструкция антитела AMG330 с двойной специфичностью в отношении CD3 и связывающего сиаловую кислоту лектина CD33, который часто экспрессируется на поверхности бластных клеток ОМЛ и стволовых лейкозных клеток. AMG330 было разработано для терапии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и вскоре будет оцениваться в исследованиях фазы I (Friedrich et al. 2014, American Association for Cancer Research, 1549-1557).

Биспецифические привлекающие Т-клетки конструкции согласно данному изобретению могут быть представлены в формате разных конструкций антител, включая, например, di-scFv или bi(s)-scFv, (scFv)₂-Fc, scFv-молнию, (scFab)₂, Fab₂, Fab₃, диатела, одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab), tandemные di-scFv, tandemные tri-scFv, "мини-тела", примеры которых имеют следующую структуру: (VH-VL-CH₃)₂, (scFv-CH₃)₂, ((scFv)₂-CH₃+CH₃), ((scFv)₂-CH₃) или (scFv-CH₃-scFv)₂, мультитела, такие как триатела или тетратела, и биспецифические однодоменные антитела, такие как нанотела, или биспецифические содержащие одиночный вариабельный домен антитела, содержащие только один вариабельный домен в одном или обоих из связывающих доменов, который может представлять собой VH, VL или VL, который специфически связывает антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов. Связывающий домен в пределах привлекающей Т-клетки молекулы/биспецифического антитела может, как правило, содержать вариабельную область легкой цепи (VL) антитела и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела; при этом он не обязательно должен содержать их обе. Fd-фрагменты, например, имеют две VH-области и часто сохраняют некоторые антигенсвязывающие функции интактного антигенсвязывающего домена. Дополнительные примеры для формата фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают (1) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, содержащий домены VL, VH, CL и CH1; (2) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, содержащий два домена VH и CH1; (4) фрагмент Fv, содержащий домены VL и VH одного плеча антитела, (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который содержит домен VH; (6) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) и (7) одноцепочечный Fv (scFv), при этом последний является предпочтительным (например, полученным из библиотеки scFv). Примеры вариантов осуществления конструкций антител в соответствии с изобретением описаны, например, в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

В этой связи авторы настоящего изобретения исследовали в *in vitro* анализах уничтожения терапевтическое действие блокирования PVR и PVRL2 также в присутствии AMG330 (фиг. 3-13). Как следствие, было неожиданно обнаружено, что AMG330 может значительно повысить цитотоксичность блокирующих PVR и/или PVRL2 антител. Соответственно предусматривается, что фармацевтическая композиция,

используемая для лечения ОМЛ, содержащая ингибиторы согласно настоящему изобретению против CD112, CD155 и/или TIGIT, может дополнительно содержать конструкцию антитела, способную к привлечению Т-клеток. Указанная конструкция антитела предпочтительно содержит связывающий CD3 домен и дополнительный связывающий домен, нацеленный на поверхностную молекулу, экспрессируемую клеткой рака крови, в частности клетками ОМЛ. Указанная поверхностная молекула выбрана из группы, состоящей из CD33, CD19 и Flt3. В соответствии с вышесказанным в настоящем изобретении предложен ингибитор против CD112, CD155, галектина-9, TIM-3 и/или TIGIT для применения в способе лечения рака крови, в частности ОМЛ, содержащий конструкцию антитела, имеющую связывающий CD3 домен и связывающий CD33 домен. В настоящем изобретении дополнительно предложен ингибитор против CD112, CD155, галектина-9, TIM-3 и/или TIGIT для применения в способе лечения рака крови, в частности ОМЛ, содержащий конструкцию антитела, имеющую связывающий CD3 домен и связывающий CD19 домен. Также в настоящем изобретении предложен ингибитор против CD112, CD155, галектина-9, TIM-3 и/или TIGIT для применения в способе лечения рака крови, в частности ОМЛ, содержащий конструкцию антитела, имеющую связывающий CD3 домен и связывающий Flt3 домен. Указанная конструкция антитела предпочтительно представляет собой связывающую молекулу, способную связываться с CD3эпсилон.

Таким образом, предусматривается, что описанная в настоящем изобретении нацеленная на CD33, CD19 или Flt3 конструкция антитела должна, помимо своей функции связываться с молекулами клеточной поверхности CD33, CD19 или Flt3 на клетке-мишени рака крови и CD3 на клеточной поверхности Т-клетки, иметь дополнительную функцию. В этом формате соединение является мультифункциональным соединением вследствие нацеливания клеток посредством связывания с CD33, CD19 или Flt3 на клеточной поверхности раковой клетки-мишени, опосредования цитотоксической активности Т-клеток посредством связывания CD3 и обеспечения дополнительной функции, такой как полностью функциональный константный Fc-домен, опосредующий антителозависимую клеточную цитотоксичность путем привлечения эффекторных клеток, таких как NK-клетки, продлевающий время полужизни домен, такой как альбуминсвязывающий домен или модифицированный константный Fc-домен с отсутствующей антителозависимой клеточной цитотоксичностью, но увеличивающий молекулярную массу соединения, опосредование метки (флуоресцентной и т.д.), терапевтический агент, такой как, например, токсин или радионуклид, и/или средства для продления времени полужизни в сыворотке и т.д. Примерами биспецифических конструкций антител, нацеленных на CD33, CD19 или Flt3 на поверхности клеток-мишеней рака крови и CD3 на клеточной поверхности Т-клетки, являются, например, молекулы, приведенные в SEQ ID NO: от 15 до 37.

Термины "связывающийся с (способный к связыванию с)", "специфически распознающий", "против" и "вступающий в реакцию с" означают в соответствии с данным изобретением, что связывающий домен способен специфически взаимодействовать с одной или более, предпочтительно по меньшей мере двумя, более предпочтительно по меньшей мере тремя и наиболее предпочтительно по меньшей мере четырьмя аминокислотами эпитопа. В контексте настоящего изобретения термины "специфически взаимодействующий", "специфически связывающий" или "специфически связывает(ют)" означают, что связывающий домен проявляет определяемую аффинность в отношении конкретного белка или антигена и в общем случае не проявляет значительную реактивность с белками или антигенами, отличными от CD33, CD19, Flt3 или CD3. "Определяемая аффинность" включает связывание с аффинностью около 10^{-6} М (КД) или больше. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда аффинность связывания составляет от около 10^{-12} до 10^{-8} М, от 10^{-12} до 10^{-9} М, от 10^{-12} до 10^{-10} М, от 10^{-11} до 10^{-8} М, предпочтительно от около 10^{-11} до 10^{-9} М. Исследовать, вступает ли связывающий домен в специфическую реакцию или связывается ли с мишенью можно, помимо прочего, сравнивая реакцию указанного связывающего домена с целевым белком или антигеном с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от CD33, CD19, Flt3 или CD3. Предпочтительно связывающий домен согласно изобретению практически не связывает или не способен связываться с белками или антигенами, отличными от CD33, CD19, Flt3 или CD3 (т. е. первый связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от CD33, CD19 или Flt3, а второй связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от CD3). Термин "практически не связывается" или "не способен связываться" означает, что связывающий домен согласно настоящему изобретению не связывает другой белок или антиген, отличный от CD33, CD19, Flt3 или CD3, т.е. не демонстрирует реактивность более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% с белками или антигенами, отличными от CD33, CD19, Flt3 или CD3, при этом связывание с CD33, CD19, Flt3 или CD3 соответственно принимается за 100%. Нацеленное на CD33, CD19 или FLT3 соединение, описанное в настоящем изобретении, также может содержать дополнительные домены, которые, например, помогают при выделении молекулы или связаны с адаптированным фармакокинетическим профилем молекулы.

Описанное в настоящем изобретении нацеленное соединение, связывающее CD33, CD19 или FLT3 и CD3, можно получать в бактериях. После экспрессии нацеленное соединение, предпочтительно конструкцию антитела, выделяют из клеточной суспензии *E. coli* в растворимую фракцию и могут очищать с

помощью, например, аффинной и/или эксклюзионной хроматографии. Конечную очистку можно проводить аналогично процессу очистки антител, экспрессируемых, например, в клетках СНО. Кроме прокариот, эукариотические микробы, такие как нитевидные грибки или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии описанных в настоящем изобретении нацеленных на CD33, CD19 или FLT3 соединений. Также в качестве хозяев можно использовать культуры клеток растений, таких как хлопок, кукуруза, картофель, соя, петуния, томат, арабидопсис и табак. Векторы для клонирования и экспрессии, применимые в получении белков в культурах растительных клеток, известны специалистам в данной области техники. Смотрите, например, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750 и Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Можно проводить прямой скрининг описанного в настоящем изобретении вещества, которое ингибирует взаимодействие CD112 и TIGIT, CD155 и TIGIT и/или галектина-9 и TIM-3. Такое вещество можно, например, идентифицировать из библиотек белков, полипептидов, пептидов, полинуклеотидов или полинуклеозидов, непептидных соединений, органических синтетических соединений или природных продуктов (например, продуктов ферментации, клеточных экстрактов, растительных экстрактов и экстрактов тканей животных). Соответственно в настоящем изобретении дополнительно раскрыт способ скрининга ингибитора против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 для применения в способе лечения рака крови, в частности ОМЛ. Описанный метод скрининга можно осуществлять методом определения клеточной функции клетки рака крови, в частности клетки ОМЛ. В этой связи в методе скрининга можно использовать клетки, экспрессирующие CD112, CD155 или галектин-9 на своей поверхности. Такие клетки включают лейкоциты, моноциты, макрофаги или антигенпрезентирующие клетки, эпителиальные клетки, опухолевые клетки, клетки карциномы или их клеточные линии.

Дополнительно раскрыт ингибитор согласно настоящему изобретению, содержащий иммуностимулятор. В контексте настоящего изобретения термин "иммуностимулятор" относится к любому адьюванту, который дополнительно стимулирует усиливающее иммунитет действие ингибиторов согласно настоящему изобретению, тем самым повышая цитотоксическую активность привлеченных Т-клеток против привлеченных опухолевых клеток. Существуют весомые свидетельства того, что пациенты с раком имеют Т-клетки, которые способны атаковать опухолевые клетки, а появление рака является следствием нарушения иммунологического надзора: способности собственной иммунной системы разрушать раковые клетки как только они появляются. Иммуностимуляторы представляют собой неспецифические агенты, которые налаживают защитную систему организма. В этой связи были описаны некоторые успехи при введении адьювантоподобных агентов непосредственно в опухоль, пероральной терапии левamisолом, интерлейкином-2 (IL-2), эффективным фактором роста для Т-клеток, интерлейкином-15 (IL-15) или альфа-интерфероном (IFN- α), если называть только некоторые.

Как описано в настоящем изобретении, ингибиторы против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 могут хорошо подходить для применения в способе лечения рака крови, в частности ОМЛ.

В контексте настоящего изобретения термин "лечить" или "лечение" означает снижать, стабилизировать или ингибировать прогрессирование рака крови, в частности ОМЛ. Нуждающиеся в лечении включают тех, кто уже страдает от заболевания. Предпочтительно лечение снижает или ингибирует пролиферационную активность клеток рака крови, приводя, таким образом, к повышению лизиса указанных раковых клеток. "Лечить" или "лечение" относится к терапевтическому лечению, когда у субъекта необходимо замедлить (ослабить) или, по меньшей мере, частично облегчить или уменьшить патологическое состояние в организме. Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже есть заболевание, а также тех, у кого предположительно разовьется заболевание. Термин "введение" относится к способу внесения соединения в клетки или ткани организма.

Соединения для применения в лечении субъекта от рака крови, в частности ОМЛ, как описано в настоящем изобретении, в общем случае вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве. Указанного терапевтически эффективного количества достаточно для ингибирования или ослабления симптомов рака крови, в частности ОМЛ. Под "терапевтическим эффектом" или "терапевтически эффективным" подразумевается, что предназначенное для применения соединение будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека, который предполагается исследователем, ветеринаром, доктором или другим медиком. Термин "терапевтически эффективный" дополнительно относится к ингибированию факторов, являющихся причиной или вносящих свой вклад в заболевание. Термин "терапевтически эффективное количество" подразумевает, что количество соединения при введении является достаточным для значительного улучшения течения заболевания, лечение которого проводят. Терапевтически эффективное количество варьирует в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести, а также от индивидуальных связанных с субъектом факторов. Следовательно, соединение согласно настоящему изобретению не будет терапевтически эффективным во всех случаях, так как раскрытый в настоящем изобретении способ не может обеспечить на 100% точный прогноз, будет ли субъект восприимчив к указанному соединению, так как здесь играют роль также индивидуальные факторы. Следует ожидать, что возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол, режим питания, взаимодействие лекарственных препаратов и тому подобное могут оказывать общее влияние на то, будет или нет со-

единение для применения в лечении субъекта, страдающего от рака крови, в частности ОМЛ, терапевтически эффективным. Предпочтительно терапевтически эффективное количество соединения, применяемого для лечения субъекта, страдающего от рака крови, в частности ОМЛ, составляет от около 0,01 мг на кг массы тела до около 1 г на кг массы тела, например около 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или около 900 мг на кг массы тела. Еще более предпочтительно терапевтически эффективное количество соединения, применяемого для лечения субъекта, страдающего от рака крови, в частности ОМЛ, составляет от около 0,01 мг на кг массы тела до около 100 мг на кг массы тела, например от около 0,1 мг на кг массы тела до около 10 мг на кг массы тела. Терапевтически эффективное количество соединения будет варьироваться с учетом массы активного соединения, которое в нем содержится, в зависимости от видов субъектов, подлежащих лечению.

В контексте настоящего изобретения термин "субъект", употребляемый также по отношению к индивиду, относится к млекопитающему. Млекопитающим может быть любое животное из мыши, крысы, морской свинки, кролика, кошки, собаки, обезьяны, лошади или человека. Соответственно млекопитающее согласно настоящему изобретению может быть человеком или отличным от человека млекопитающим. Таким образом, способы, применения и композиции, описанные в настоящем изобретении, в общем случае применимы как к людям, так и к отличным от людей млекопитающим. Если субъект является человеком, который может получать композицию для применения в лечении заболевания, как описано в настоящем изобретении, он также называется "пациентом". В контексте настоящего изобретения то, что касается "пациента", также применимо к группе пациентов и наоборот.

Введение ингибиторов для применения в лечении субъекта, страдающего от рака крови, в частности ОМЛ, в соответствии с настоящим изобретением можно проводить любым известным в данной области техники способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение проводят перорально, парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, путем закапывания в нос, путем имплантации, путем внутриполостной или интравезикальной инстилляцией, интраокулярно, внутриартериально, внутриочагово, трансдермально или путем применения к слизистым оболочками или комбинированно, если называть только некоторые способы.

В объеме настоящего изобретения, например, предусматривается, что терапевтическое действие применяемых ингибиторов обнаруживается путем оценки числа клеток рака крови у пациента с применением доступных в данной области техники способов, например, с помощью подсчета и лейкоцитарной формулы белых кровяных телец (БКТ или лейкоцитов). Белые кровяные тельца можно подсчитывать вручную на гемоцитометрах (камера Нойбауэра) или с помощью автоматических счетчиков. Чтобы определить лейкоцитарную формулу, необходимо тонким слоем распределить каплю крови по предметному стеклу, высушить на воздухе и окрасить красителем Романовского, наиболее часто с применением метода Райта или Май-Грюнвальда-Гимза. Затем клетки подсчитывают и классифицируют, используя морфологическое исследование и/или гистохимию, как описано в Blumenreich M.S. The White Blood Cell and Differential Count. In: Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.W., editors. Clinical Methods: The History, Physics, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 153. В альтернативном варианте лейкоциты выделяют из образца крови и окрашивают флуоресцентно-мечеными антителами против маркеров клеточной поверхности лейкоцитов, а после этого анализируют методом проточной цитометрии для подсчета абсолютного числа клеток для каждой субпопуляции лейкоцитов. В дополнительном или альтернативном варианте также возможно оценить общее состояние соответствующего пациента, что также поможет специалисту-практику определить, является ли терапия эффективной. Специалистам в данной области техники известно большое количество других способов, которые помогают специалисту-практику наблюдать терапевтическое действие соединения для применения в лечении рака крови, в частности ОМЛ, как раскрыто в настоящем изобретении в контексте способа или применения согласно настоящему изобретению.

Хотя возможно непосредственно вводить ингибиторы согласно настоящему изобретению без какого-либо разработанного состава, в другом аспекте настоящего изобретения соединения предпочтительно применяют в форме фармацевтической или ветеринарной композиции, содержащей фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество и соединение согласно настоящему изобретению, предпочтительно иммуноглобулин согласно настоящему изобретению. Носитель, применяемый в комбинации с соединением согласно настоящему изобретению, содержит в основе воду и образует водный раствор. Альтернативой водному раствору носителя является раствор носителя на масляной основе, содержащий соединение согласно настоящему изобретению. Как водный, так и масляный растворы дополнительно содержат загустители для образования композиции с вязкостью жидкой мази, крема, мази, геля или тому подобного. Подходящие загустители хорошо известны специалистам в данной области техники. В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения также можно использовать твердый носитель, содержащий соединение для применения в лечении S100A12:TLR4/MD2/CD14-опосредованного воспалительного нарушения, как раскрыто в другом месте настоящего изобретения. Это дает возможность применения альтернативного варианта осуществления с помощью аппликатора-палочки, пластыря или суппозитория. Твердый носитель дополнительно содер-

жит загустители для получения композиции с консистенцией воска или парафина.

Также возможно применять дополнительное лечение ОМЛ в комбинации с ингибиторами согласно настоящему изобретению для применения в лечении субъекта, страдающего от рака крови, в частности ОМЛ. Дополнительное лечение ОМЛ можно в общем случае применять до, одновременно и/или после применения способов согласно изобретению.

Стандартным лечением ОМЛ является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Этот термин в общем случае относится к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, обычно полученных из костного мозга или крови, и включает аутологичную (т.е. стволовые клетки получены от пациента) и аллогенную (т.е. стволовые клетки получены от донора) ТГСК. Для лечения ОМЛ в общем случае предпочтительнее аллогенная ТГСК. Также подразумевается, что применения и способы согласно настоящему изобретению можно применять до или после ТГСК, или и до и после, или между двумя курсами лечения ТГСК.

Пациенты (или группы пациентов), проходящие лечение в соответствии со способами согласно изобретению, могут также получать химиотерапевтическое лечение. В контексте настоящего изобретения "химиотерапевтическое лечение" относится к лечению антинеопластическим агентом или комбинацией из более чем одного таких агентов по стандартизированной схеме лечения. В контексте настоящего изобретения "химиотерапевтическое лечение" включает применение любого антинеопластического агента, включая органические молекулы небольшого размера, пептиды, олигонуклеотиды и тому подобное. Агенты, включенные в определение химиотерапии, представляют собой, без ограничения, алкилирующие агенты, например мехлорэтамин, циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, ифосфамид, бусульфан, N-нитрозо-N-метилмочевину (MNU), кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (MeCCNU), фотемустин, стрептозотозин, дакарбазин, митозоломид, темозоломид, тиотепу, митомицин, диазиковон (AZQ), цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, прокарбазин и гексаметилмеламин; антиметаболиты, например метотрексат, пеметрексед, фторурацил, капецитабин, цитарабин, гемцитабин, децитабин, вайдазу, флударабин, неларабин, кладрибин, клофарабин, пентостатин, тиогуанин, меркаптопурин; антимикротрубочковые агенты, например винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин, винфлюнин, паклитаксел, доцетаксел, подофиллотоксин; ингибиторы топоизомеразы, например иринотекан, топотекан, этопозид, доксорубин, митоксантрон, тенипозид, новобицин, мербарон, акларубин; цитотоксические антибиотики, например актиномицин, блеомицин, пликамицин, митомицин, доксорубин, даунорубин, эпирубин, идарубин, пирарубин, акларубин и митоксантрон, если называть только некоторые. Однако специалисту в данной области техники понятно, что изобретение не ограничено этими химиотерапевтическими агентами и может включать применение также других повреждающих ДНК агентов. Указанную комбинацию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в виде комбинированного состава или отдельно друг от друга.

Дополнительное лечение ОМЛ включает лучевую терапию. Также предусматривается лечение или профилактика ЦНС с целью предотвращения распространения злокачественных клеток в ЦНС, например, посредством интратекальной химиотерапии и/или лучевой терапии головного и спинного мозга.

Так как авторы настоящего изобретения предполагают, что терапевтический успех раскрытых в настоящем изобретении ингибиторов может быть основан (частично) на иммуностимулирующей активности указанных ингибиторов вследствие ингибирования контрольных точек иммунного ответа, описанных в настоящем изобретении, что, таким образом, приводит к повышению Т-клеточной противораковой активности, также подразумевается наличие индукторов и энхансеров активации и/или пролиферации Т-клеток, CAR Т-клеток, донорных Т-клеток, антител к антигену 4, ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4) и других.

Настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей ингибитор контрольных точек иммунного ответа против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT, описанный в другом месте настоящего описания, и конструкцию антитела, способную к привлечению Т-клеток, описанную в другом месте настоящего изобретения.

Указанная фармацевтическая композиция может содержать терапевтически эффективное количество одного или нескольких описанных в настоящем изобретении ингибиторов иммунных контрольных точек и/или конструкций антител вместе с фармацевтически эффективными разбавителями, носителем, солюбилизатором, эмульсификатором, консервантом и/или адьювантом. Описанные в настоящем изобретении фармацевтические композиции включают, но не ограничиваются этим, жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции. Предпочтительно материалы состава являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях.

В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции для введения пациенту, предпочтительно человеку. Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит подходящие составы носителей, стабилизаторов и/или вспомогательных веществ. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит композицию для парентерального, трансдермального, интралимфатического, внутриартериального, интратекального и/или интраназального введения или для прямой инъекции в ткань. В частности, подразумевается, что указанную композицию вводят пациенту путем инфузии или инъекции. Введение подходящих компози-

ций можно осуществлять разными путями, например путем внутривенного, внутривнутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного или интрадермального введения. В частности, в настоящем изобретении предложено непрерывное введение подходящей композиции. В качестве неограничивающего примера непрерывное, т.е. постоянное введение можно осуществлять с помощью небольшой насосной системы, носимой пациентом, для дозирования поступления терапевтического агента в организм пациента, как описано в WO 2015/036583.

Композиции согласно изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают растворы, например фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы, липосомы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, можно составлять хорошо известными традиционными способами. Составы могут содержать углеводы, буферные растворы, аминокислоты и/или поверхностно-активные вещества. Углеводы могут представлять собой нередуцирующие сахара, предпочтительно трегалозу, сахарозу, октасульфат, сорбит или ксилит. В общем случае в контексте настоящего изобретения "фармацевтически приемлемый носитель" означает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты, совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают дополнительные буферные агенты; консерванты; соразтворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры; солеобразующие противоионы, такие как натрий, многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аланин, глицин, аспарагин, 2-фенилаланин и треонин; сахара или сахарные спирты, такие как трегалоза, сахароза, октасульфат, сорбит или ксилит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миоинизитоза, галактоза, лактит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстанавливающие агенты, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; и гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон. Такие составы можно применять для непрерывного введения, которое может быть внутривенным или подкожным, с применением насосных систем и/или без. Аминокислоты могут представлять собой заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, лизинацетат, аргинин, глутамат и/или гистидин. Поверхностно-активные вещества могут быть детергентами предпочтительно с молекулярной массой >1,2 кДа и/или полиэфирами предпочтительно с молекулярной массой >3 кДа. Неограничивающими примерами предпочтительных детергентов являются Твин 20, Твин 40, Твин 60, Твин 80 или Твин 85. Неограничивающими примерами предпочтительных полиэфиров являются ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 или ПЭГ 5000. Буферные системы, применяемые в настоящем изобретении, могут иметь предпочтительный уровень pH 5-9 и могут содержать цитрат, сукцинат, фосфат, гистидин и ацетат.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которую можно определить, например, в исследовании с повышением дозы путем введения возрастающих доз описанного в настоящем изобретении полипептида, демонстрирующего межвидовую специфичность, описанную в настоящем изобретении, с отличными от шимпанзе приматами, например макаками. Как указано выше, описанную в настоящем изобретении нацеленную на CD33 композицию, демонстрирующую межвидовую специфичность, описанную в настоящем изобретении, можно преимущественно использовать в идентичной форме в доклинических исследованиях на отличных от шимпанзе приматах и в качестве лекарственного препарата на людях. Эту композицию или эти композиции также можно вводить в комбинации с дополнительными белковыми или небелковыми лекарственными препаратами. Эти лекарственные препараты можно вводить одновременно с композицией, содержащей описанный в настоящем изобретении полипептид, или отдельно до или после введения указанного полипептида с определенными временными интервалами и дозами. Схему дозирования определяет лечащий врач с учетом клинических факторов. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые лекарственные препараты.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные и неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые растворы и забуференные среды. Парентеральные базовые растворы включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или жирные масла. Внутривенные базовые растворы включают пополнители жидкости и питательных веществ, пополни-

тели электролитов (например, на основе декстрозы Рингера) и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и тому подобное. Кроме того, композиция согласно настоящему изобретению может содержать белковые носители, такие как, например, сывороточный альбумин или иммуноглобулин, предпочтительно человеческого происхождения. Подразумевается, что композиция согласно изобретению может содержать, кроме описанного в настоящем изобретении полипептида, дополнительные биологически активные агенты в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такие агенты могут представлять собой лекарственные препараты, действующие на желудочно-кишечную систему, лекарственные препараты, действующие как цитостатики, лекарственные препараты, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные препараты, ингибирующие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные препараты, модулирующие воспалительный ответ, лекарственные препараты, действующие на систему кровообращения, и/или агенты, такие как цитокины, известные в данной области техники. Также подразумевается, что композиция согласно настоящему изобретению, содержащая нацеленное на CD33 соединение и по меньшей мере один эпигенетический фактор в одном или отдельных составах, применяется в виде дополнительной совместной терапии, т.е. в комбинации с другим противораковым медикаментом.

Биологическую активность описанных в настоящем изобретении фармацевтических композиций можно определить, например, с помощью анализа цитотоксичности, как описано в следующих примерах, в WO 99/54440 или в Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). В контексте настоящего изобретения "эффективность" или "in vivo эффективность" относится к ответу на терапию фармацевтической композицией согласно изобретению с применением, например, стандартизированных критериев ответа NCI. Успех или in vivo эффективность терапии с применением фармацевтической композиции согласно изобретению относится к эффективности композиции в отношении ее предполагаемой цели, т.е. способности композиции осуществлять необходимое действие, т.е. снижение количества патологических клеток, например раковых клеток. In vivo эффективность можно исследовать установленными стандартными способами для соответствующих нозологических форм, включая, но не ограничиваясь этим, подсчет белых кровяных телец, лейкоцитарную формулу, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), аспирацию костного мозга. Кроме того, можно использовать различные специфические в отношении заболевания клинические химические параметры и другие установленные стандартные способы. Кроме того, можно использовать компьютерную томографию, рентген, ядерную магнитно-резонансную томографию (например, для оценки ответа на основании критериев Национального института рака [Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., Shipp M.A., Fisher R.I., Connors J.M., Lister T.A., Vose J., Grillo-Lopez A., Hagenbeek A., Cabanillas F., Klippensten D., Hiddemann W., Castellino R., Harris N.L., Armitage J.O., Carter W., Hoppe R., Canellios G.P. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1244]), позитронно-эмиссионную томографию, подсчет белых кровяных телец, лейкоцитарную формулу, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), аспирацию костного мозга, биопсию/гистологию лимфатических узлов и различные специфические в отношении лимфомы клинические химические параметры (например, уровень лактатдегидрогеназы) и другие установленные стандартные способы.

Другой важной задачей в разработке лекарственных препаратов, таких как фармацевтические композиции согласно изобретению, является прогнозируемая модуляция фармакокинетических свойств. С этой целью можно проводить определение фармакокинетического профиля потенциального лекарственного препарата, т.е. профиля фармакокинетических параметров, которые влияют на способность конкретного лекарственного препарата лечить заданное патологическое состояние. Фармакокинетические параметры лекарственного препарата, влияющие на способность лекарственного препарата лечить определенную нозологическую форму, включают, но не ограничиваются этим: время полужизни, объем распределения, пресистемный метаболизм в печени и степень связывания сыворотки крови. На эффективность заданного лекарственного агента может влиять каждый из вышеприведенных параметров. "Время полужизни" означает время, за которое 50% введенного лекарственного препарата выводится посредством биологических процессов, например метаболизма, выделения и т.д. Под "пресистемным метаболизмом в печени" подразумевается предрасположенность лекарственного препарата к метаболизированию после первого контакта с печенью, т.е. во время первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удержания лекарственного препарата в различных компартментах организма, таких как, например, внутриклеточное и внеклеточное пространство, ткани и органы и т.д., и распределение лекарственного препарата в этих компартментах. "Степень связывания сыворотки крови" означает предрасположенность лекарственного препарата к взаимодействию и связыванию с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к снижению или утрате биологической активности лекарственного препарата.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, латентный период (Tlag), Tmax, скорость всасывания, начало (more onset) и/или Cmax для заданного количества вводимого лекарственного препарата. "Биодоступность" означает количество лекарственного препарата в компартменте крови.

"Латентный период" означает время, проходящее между введением лекарственного препарата и его обнаружением и определением в крови или плазме. "Tmax" - это время, за которое достигается максимальная концентрация лекарственного препарата в крови, а "Cmax" - это максимальная концентрация в крови, получаемая для заданного лекарственного препарата. На время, необходимое для достижения концентрации лекарственного препарата в крови или ткани, требуемой для его биологического действия, влияют все параметры.

В контексте настоящего изобретения термин "токсичность" относится к токсическому действию лекарственного препарата, проявляемому в виде нежелательных явлений или тяжелых нежелательных явлений. Эти побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости лекарственного препарата в общем и/или отсутствию локальной переносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенное или канцерогенное действие лекарственного препарата.

В контексте настоящего изобретения термин "безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" определяет введение лекарственного препарата без индукции тяжелых нежелательных явлений непосредственно после введения (локальная переносимость) и во время более длительного периода применения лекарственного препарата. "Безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" можно оценивать, например, через регулярные интервалы во время лечения и последующего периода. Определение включает клиническую оценку, например, органные проявления, и исследования лабораторных аномалий. Можно проводить клиническую оценку и записывать/кодировать отклонения от нормальных показателей в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Органные проявления могут включать критерии, такие как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и тому подобное, как описано, например, в Общей терминологии критериев нежелательных явлений v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые можно исследовать, включают, например, гематологию, клиническую химию, профиль коагуляции и анализ мочи, а также исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка, плазма, лимфа или цереброспинальная жидкость, ликвор и тому подобное. Таким образом, безопасность можно оценивать, например, посредством физического осмотра, методов визуализации (т.е. ультразвука, рентгена, КТ-сканов, магнитно-резонансной томографии (МРТ)), других измерений с помощью технических устройств (т.е. электрокардиограммы), показателей жизнедеятельности, путем измерения лабораторных параметров и записи нежелательных явлений. Например, нежелательные явления у отличных от шимпанзе приматов в применениях и способах согласно изобретению можно исследовать гистопатологическими и/или гистохимическими методами.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого действия. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для лечения или, по меньшей мере, частичного прекращения заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего от заболевания. Количества, эффективные для такого применения, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы субъекта. Термин "пациент" включает человека и других млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение. В контексте настоящего изобретения термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к переносимой дозе фармацевтической композиции (т.е. фармацевтической композиции, содержащей ингибитор против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 и CAR T-клетку или конструкцию антитела, привлекающую T-клетки, в одном или отдельных составах), которая является достаточно высокой для того, чтобы привести к снижению количества патологических клеток, уничтожению опухоли, уменьшению размеров опухоли или стабилизации заболевания без или практически без проявления основных токсических явлений. Такие эффективные и нетоксичные дозы можно определить, например, в исследованиях с повышением дозы, описанных в данной области техники, при этом они должны быть ниже дозы, индуцирующей тяжелые нежелательные побочные явления (дозолимитирующая токсичность, ДЛТ).

Вышеуказанные термины также относятся, например, к доклинической оценке безопасности полученных с помощью биотехнологий фармацевтических препаратов S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997. Соответствующая дозировка или терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей ингибитор согласно настоящему изобретению и CAR T-клетку или конструкцию антитела, как описано в другом месте настоящего изобретения, зависит от подлежащего лечению патологического состояния, тяжести патологического состояния, предыдущей терапии и анамнеза пациента и его восприимчивости к терапевтическому агенту. Надлежащую дозу можно корректировать в соответствии с заключением лечащего врача таким образом, чтобы ее можно было вводить пациенту один раз или в течение серии введений. Фармацевтическую композицию можно вводить в виде единственного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными вариантами терапии, такой как противораковая терапия, в случае необходимости.

Фармацевтические композиции согласно данному изобретению в особенности применимы для парентерального введения, т.е. подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного и/или внутрисиновиального. Парентеральное введение может представлять собой болюсную инъекцию или непрерывную инфузию. Если фармацевтическая композиция была лиофилизирована, лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лيوфилизиро-

ванный материал можно восстанавливать, например, в бактериостатической воде для инъекций (БВДИ), физиологическом солевом растворе, фосфатно-солевом буфере (ФСБ) или в том же составе, в котором белок находился перед лиофилизацией.

В связи с настоящим изобретением неожиданно было обнаружено, что комбинация ингибитора согласно настоящему изобретению и биспецифической конструкции антитела AMG330 значительно повышает клеточный лизис клеток ОМЛ дозозависимым образом по сравнению с клеточным лизисом, вызываемым одними блокирующими антителами против CD112 и CD155 (фиг. 3-13). Это открытие подтверждает предположение, что комбинация ингибитора против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 и нацеленного на CD33, CD19 или Flt3 антитела, привлекающего Т-клетки, будет синергетически более эффективной, чем любой из вариантов терапии, применяемый в отдельности. Соответственно описанное введение одного или более ингибиторов против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 в комбинации с описанным в настоящем изобретении нацеленным на CD33, CD19 или Flt3 антителом, привлекающим Т-клетки, может позволить применять более низкие дозы биспецифического привлекающего Т-клетки антитела для обеспечения эффективности в заданный момент времени. Перенаправленный лизис клеток-мишеней посредством привлечения Т-клеток мультиспецифической, по меньшей мере, биспецифической конструкцией включает образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Привлеченные Т-клетки способны последовательно осуществлять лизис клеток-мишеней и на них не действуют механизмы уклонения от иммунологического надзора, препятствующие процессингу и презентации пептидного антигена или клональной дифференцировке Т-клеток; смотрите, например, WO 2007/042261 или WO 2008/119567.

Описанные в настоящем изобретении составы используют в качестве фармацевтических композиций для лечения патологического состояния, описанного в настоящем изобретении, у нуждающегося в этом пациента. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение состава в организм, выделенную ткань или клетку от пациента, имеющего заболевание/нарушение, симптом заболевания/нарушения или предрасположенного к заболеванию/нарушению, с целью излечения, исцеления, смягчения, облегчения, изменения, исправления, снижения интенсивности, улучшения или влияния на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию. "Нуждающиеся в лечении" включают тех, кто уже имеет нарушение, а также тех, у кого необходимо предотвратить нарушение. Термин "заболевание" представляет собой любое патологическое состояние, на которое лечение описанными в настоящем изобретении белковыми составами окажет положительное действие. Он включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают к накоплению к рассматриваемому заболеванию. Неограничивающие примеры заболеваний/нарушений, которые можно лечить согласно данному документу, включают описанные в настоящем изобретении различные виды рака крови, в частности миелоидный лейкоз, такой как ОМЛ.

Фармацевтическая композиция может содержать сопутствующие материалы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции. В таких вариантах осуществления изобретения подходящие сопутствующие материалы включают, но не ограничиваются этим, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемобразующие агенты (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульсифицирующие агенты; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, фенолсодержащий спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); агенты, повышающие тоничность (такие как галиды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средства доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адъюванты. Смотрите REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Оптимальную фармацевтическую композицию определяет специалист в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и необходимой дозировки. Смотрите, например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариан-

тах осуществления изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения и скорость *in vivo* выведения описанных в настоящем изобретении антигенсвязывающих белков. В определенных вариантах осуществления изобретения основной базовый раствор или носитель в фармацевтической композиции может быть по природе водным или неводным. Например, подходящий базовый раствор или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную цереброспинальную жидкость с возможным дополнением другими материалами, обычными в композициях для парентерального введения. Дополнительными примерами базовых растворов являются нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат трис-буфер с pH около 7,0-8,5 или ацетатный буфер с pH около 4,0-5,5 и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах осуществления изобретения композиции описанного в настоящем изобретении человеческого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или описанной в настоящем изобретении конструкции антитела можно готовить для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень очистки, с необязательными агентами для образования состава (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления изобретения ингибитор против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 и CAR T-клетку или конструкцию антитела, привлекающую T-клетки, можно получить в виде лиофилизата, используя подходящие вспомогательные вещества, такие как сахара.

Описанная в настоящем изобретении фармацевтическая композиция может быть предназначена для парентеральной доставки. В альтернативном варианте композиции могут быть предназначены для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например пероральной доставки. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в компетенции специалистов в данной области техники. Составляющие компоненты предпочтительно присутствуют в концентрациях, приемлемых для места введения. В определенных вариантах осуществления изобретения используют буферы для поддержания композиции при физиологическом уровне pH или немного меньшем pH, как правило, в пределах диапазона pH от около 5 до около 8.

Дополнительные фармацевтические композиции будут очевидны для специалистов в данной области техники, включая составы, содержащие ингибитор против CD112, CD155 и/или TIGIT и конструкцию антитела, привлекающую T-клетки, как описано в настоящем изобретении, в составах с длительной или контролируемой доставкой. Способы получения различных составов с длительной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции, также известны специалистам в данной области техники. См., например, международную заявку на патент № WO 9315722, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с длительным высвобождением могут содержать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок, или микрокапсулы. Матрицы для длительного высвобождения могут содержать сложные полиэфир, гидрогели, полилактиды (как раскрыто в патенте США № 3773919 и публикации европейской патентной заявки № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация европейской патентной заявки № EP 133988). Композиции с длительным высвобождением также могут содержать липосомы, которые можно получать любым из нескольких известных в данной области техники способов. Смотрите, например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публикации европейских патентных заявок №№ EP 036676, EP 088046 и EP 143949.

Фармацевтические композиции, используемые для *in vivo* введения, как правило, представлены в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществлять путем фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию с применением этого способа можно проводить как до, так и после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции в общем случае помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например пакет с внутривенным раствором или флакон, имеющий пробку, прокалываемую гиподермической иглой для инъекций. В соответствии с определенными вариантами осуществления изобретения можно использовать соли, например, для корректировки ионной силы и/или изотоничности состава и/или для улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с изобретением. Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем защиты заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, а именно притяжения и отталкивания. Ионы также стабилизируют денатурированное состояние белка, в частности, путем связывания с денатурированными пептидными связями (--CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может снижать межмолекулярные электростатические

взаимодействия и, таким образом, предотвращать или снижать агрегацию или нерастворимость белка.

Было разработано некоторое количество категориальных классификаций ионов и их действия на белки, которые можно использовать при составлении фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, в котором ионные и полярные неионные растворенные компоненты упорядочены по их действию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные компоненты называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные компоненты называются "хаотропными". Космотропы обычно применяют в высоких концентрациях (например, >1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливания"). Хаотропы обычно применяют для денатурации и/или для солюбилизации белков ("всаливания"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их позицию в ряду Гофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения в качестве объемобразующих агентов, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных применений. Лизин, пролин, серин и аланин можно использовать для стабилизации белков в составе. Глицин применяют при лиофилизации для гарантирования правильной структуры и свойств таблетки. Аргинин можно применять для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта. Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, а также, в контексте настоящего изобретения, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Их применяют в качестве стабилизирующих агентов как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физического и химического распада. Полиолы применяют для корректировки тоничности составов.

Составы могут дополнительно содержать один или более антиоксидантов. Нежелательное окисление белков можно в некоторой степени предотвратить в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней внешнего кислорода и температуры и избегая воздействия света. Вспомогательные антиоксиданты также можно применять для предотвращения окислительного разрушения белков. Среди применимых в этой связи антиоксидантов находятся восстанавливающие агенты, поглотители свободных кислородных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах в соответствии с изобретением предпочтительно растворимы в воде и сохраняют свою активность в течение срока годности продукта. В этой связи ЭДТА является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с изобретением.

Антиоксиданты могут повреждать белки. Например, восстанавливающие агенты, такие как, в частности, глутатион, могут разрушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в изобретении выбирают так, чтобы, помимо прочего, устранить или значительно снизить возможность повреждения ими самими белков в составе. Составы в соответствии с изобретением могут содержать ионы металлов, которые являются белковыми кофакторами и необходимы для образования белковых координационных комплексов, например цинк, необходимый для получения некоторых инсулиновых суспензий. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. При этом ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Как можно ожидать, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной, чем разработка лиофилизированных составов. Сублимированные продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать содержащим консервант разбавителем в момент применения. Это снижает время контакта консерванта с белком, что значительно минимизирует связанный с этим риск для стабильности. В случае жидких составов эффективность и стабильность консерванта необходимо поддерживать на протяжении всего срока годности продукта (от около 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что консервант должен демонстрировать эффективность в конечном составе, содержащем активный лекарственный препарат и все вспомогательные компоненты.

После составления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить как в готовой к применению форме, так и в форме (например, лиофилизированной), которая восстанавливается перед введением. В изобретении также предложены наборы для получения единицы для однократного введения дозы. В определенных вариантах осуществления данного изобретения предложены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью или шприцы с лиофилизатом). Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей ингибитор против CD112, CD155, TIGIT, галектина-9 и/или TIM-3 и CAR T-клетку или конструкцию антитела, привлекающую T-клетки, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и обстоятельств. Специалисту в данной области техники понятно, что соответствующие уровни дозировок для лечения будут варьироваться частично в зависимости от доставляемой молекулы, показаний, по которым используется описанная в настоящем изобретении композиция, пути введения и размера (массы тела, площади поверхности тела или размеров органов) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента.

В определенных вариантах осуществления изобретения медицинский работник может титровать дозировку и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типовая дозировка может находиться в диапазоне от около 0,1 мкг/кг до около 30 мг/кг или более в зависимости от вышеуказанных факторов. В конкретных вариантах осуществления изобретения дозировка может находиться в диапазоне от 1,0 мкг/кг до около 20 мг/кг, необязательно, от 10 мкг/кг до около 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до около 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции согласно изобретению, содержащей ингибитор против CD112, CD155 и/или TIGIT, или, как описано здесь, галектина-9 и/или TIM-3 и, как описано здесь, CAR T-клетку или конструкцию антитела, привлекающую T-клетки, как описано в другом месте настоящего изобретения, предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или продолжительности бессимптомных периодов или предотвращению нарушений или неспособности вследствие поражения заболеванием. Для лечения экспрессирующих CD112, CD155 и/или галектин-9 опухолей терапевтически эффективное количество раскрытой в настоящем изобретении композиции предпочтительно ингибирует клеточный рост или рост опухоли по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80% или по меньшей мере на около 90% по сравнению с пациентами, не проходящими лечение. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить на животной модели, прогнозирующей эффективность в случае человеческих опухолей.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196, 4439196, 4447224, 4447233, 4486194, 4487603, 4596556, 4790824, 4941880, 5064413, 5312335, 5312335, 5383851 и 5399163.

Следует отметить, что описанные в настоящем изобретении ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, а также все описанные в настоящем изобретении касающиеся их варианты осуществления могут быть предназначены для применения в способах лечения рака крови, такого как лейкоз или лимфома, в частности ОМЛ, включающих введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества указанного ингибитора.

Аналогично, описанные в настоящем изобретении ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, а также все описанные в настоящем изобретении касающиеся их варианты осуществления можно применять для приготовления фармацевтической композиции для применения в лечении рака крови, такого как лейкоз или лимфома, в частности ОМЛ.

Примеры

Следующие примеры приведены в целях иллюстрации конкретных вариантов осуществления или признаков настоящего изобретения. Эти примеры не следует воспринимать как ограничивающие данное изобретение. Данные примеры включены в целях иллюстрации, а настоящее изобретение ограничивается только формулой изобретения.

Образцы от 140 не проходивших ранее лечения пациентов с впервые диагностированным ОМЛ (AMLSG 07-04, NCT00151242) анализировали методом ОТ-кПЦР в отношении экспрессии молекул контрольных точек иммунного ответа PVR, PVRL2 и галектина-9 (Gal-9). Экспрессия коррелировала с демографией пациентов (возраст, кариотип, мутационный статус FLT3) и данными по клинической выживаемости по многофакторной регрессионной модели Кокса. Большинство пациентов демонстрировало экспрессию мРНК PVR (94%), PVRL2 (95%) и Gal-9 (92%). В многофакторной поэтапной регрессионной модели Кокса неблагоприятный кариотип, высокая экспрессия PVR и Gal-9, были определены как независимые прогностические маркеры ($p < 0,001$, HR: 2,10, CI 1,39-3,15 для кариотипа; $p = 0,001$, HR: 1,64, CI 1,21-2,21 для PVR и $p < 0,001$, HR: 0,67, CI 0,54-0,84 для Gal-9). Из-за высокой корреляции между PVR и PVRL2 (ро Пирсона=0,827, $p < 0,001$) PVRL2 убирали во время поэтапного процесса. Несмотря на это, если PVR исключали из многофакторной регрессионной модели Кокса, PVRL2 оставался значительным параметром в поэтапной процедуре в дополнение к кариотипу и Gal 9 ($p = 0,003$, HR: 1,58, CI 1,17-2,13 для PVRL2). Во второй независимой группе пациентов, включающей данные по генной экспрессии на основании анализа на ДНК-микрочипах и клинические данные по 291 пациенту с ОМЛ (Verhaak et al., Haematologica 2009;94), высокая экспрессия PVR и PVRL2 в отличие от экспрессии CD80, CD86 или PD-L1 была связана с плохой общей выживаемостью (логарифмический ранговый критерий $p = 0,003$ и $p = 0,032$ соответственно). В *in vitro* анализе уничтожения терапевтическое действие блокирования PVR и PVRL2 исследовали методом FACS с применением окрашивания 7-AAD. Линии клеток ОМЛ MV4-11, Kasumi-1 и Molm-13 предварительно инкубировали с блокирующими антителами против PVR, PVRL2 или их обоих и совместно культивировали в течение 24 ч с мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) от здоровых доноров в присутствии или отсутствии AMG330.

В отсутствие AMG330 уничтожение клеток MV4-11 возросло от $12,6 \pm 4,7\%$ (контроль) до $33,0 \pm 8,8\%$ (PVR), до $40,4 \pm 10,4\%$ (PVRL2) и до $56,0 \pm 12,0\%$ (оба PVR+PVRL2). В присутствии субоптимальной концентрации AMG330 (0,1 нг/мл) лизис клеток MV4-11 соответствовал $29,4 \pm 9,0\%$ (только AMG330),

49,7±12,6% (AMG330+PVR), 57,9±11,3% (AMG330+PVRL2) и 70,0±9,8% (AMG330+PVR+PVRL2; n=4, p<0,05 для всех сравнений). Сравнимые результаты были получены для Kasumi-1 и Molm-13, при этом блокирование обоих ингибиторов контрольных точек было наиболее эффективным лечением, хотя дополнительное действие антител против PVR и PVRL2 нельзя было подтвердить во всех случаях (данные не показаны). Для подтверждения специфичности подхода и для исключения эффектов, вызываемых антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), создавали двойной нокаут PVR и PVRL2 в линии клеток MV4-11 с помощью CRISPR/Cas-9. Значительное повышение уничтожения наблюдали в клетках с двойным нокаутом PVR и PVRL2 по сравнению с клетками дикого типа (40,5±8,1% против 25,9±9,1; n=3, p<0,001). Дополнительные эксперименты с применением нерелевантного антитела против CD117 или блокирования Fcγ-рецептора очищенными антителами IgG исключали возможность АЗКЦ, подтверждая функциональную обоснованность блокирования PVR/PVRL2.

Экспрессия лигандов контрольных точек иммунного ответа PVR и PVRL2 обеспечивает негативный прогноз для пациентов с ОМЛ, возможно, вследствие уклонения от иммунологического надзора. Мы могли дополнительно показать, что уничтожение клеток ОМЛ МКПК можно усилить путем блокирования этими новыми ингибиторами контрольных точек. Кроме того, добавление блокирующих PVR и/или PVRL2 антител к AMG330 может повысить цитотоксичность. Следовательно, блокирование PVR и PVRL2 представляет перспективную мишень для лечения ОМЛ.

Прогностическое влияние PVR, PVRL2 и галектина-9 при ОМЛ.

Экспрессию мРНК PVR, PVRL2 и галектина-9 у 140 пациентов с впервые диагностированным ОМЛ анализировали методом количественной ОТ-ПЦР, используя LightCycler 96 (Roche, Basel, Switzerland). Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) служила эталонным геном. Использовали следующие праймеры: PVR прямой 5' agcaggagcgtggatattctg 3' (SEQ ID No: 1), PVR, обратный 5' gactgtgccagacaggaacc 3' (SEQ ID No: 2), PVRL2, прямой 5' gaggacgaggccaactacac 3' (SEQ ID No: 3), PVRL2, обратный 5' agggatgagagccaggagat 3' (SEQ ID No: 4), галектин-9, прямой 5' gtctccaggacggacttcag 3' (SEQ ID No: 5), галектин-9, обратный 5' caggaagcagagtgcaaaagg 3' (SEQ ID No: 6), GAPDH, прямой 5' gtcagtgtggacactgacct 3' (SEQ ID No: 7), GAPDH, обратный 5' tgctgtagccaaattcggtg 3' (SEQ ID No: 8). Для каждого гена определяли отсекающий параметр, делящий группу пациентов с ОМЛ на пациентов с низкой и высокой экспрессией. Генная экспрессия коррелировала с демографией пациентов (возраст, кариотип, мутационный статус FLT3) и данными по клинической выживаемости согласно многофакторной регрессионной модели Кокса. Статистический анализ осуществляли с помощью SPSS 17 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Экспрессия белков PVR, PVRL2 и галектина-9.

Экспрессию белков PVR и PVRL2 анализировали в линиях клеток ОМЛ и первичных клетках ОМЛ методом проточной цитометрии (FACSCalibur и программное обеспечение CellQuestPro, BD Biosciences), используя следующие антитела: мышиный анти-PVR клон D171 (Thermo Scientific™ Lab Vision, Waltham, MA) и мышиный анти-PVRL2 клон L14 (Bottino et al., J Exp Med 2003; 198:557-567) в качестве первичных антител и антитело против мышиного APC в качестве вторичного антитела. Галектин-9 окрашивали непосредственно APC-меченым мышиным античеловеческим антителом (клон 9M1-3; Biozol, Eching, Germany).

Т-клетки индуцировали лизис клеток ОМЛ.

В качестве источника Т-клеток использовали лейкоцитарные пленки от здоровых доноров. Фракцию мононуклеарных клеток (МНК) выделяли, используя центрифугирование в градиенте Ficoll-Paque. Клетки ОМЛ предварительно окрашивали зеленым красителем CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies) в течение одного часа и дважды промывали клеточной культуральной средой. Предварительно окрашенные клетки-мишени ОМЛ смешивали с содержащей Т-клетки фракцией МНК в соотношении 1:6 и высевали в 96-луночный планшет (200000 клеток на лунку).

Клеточную смесь предварительно инкубировали с клоном блокирующего PVR антитела D171 (4-20 мкг/мл; Thermo Scientific™ Lab Vision), клоном блокирующего PVRL2 антитела L14 (5-20 мкл супернатанта клеточной культуры; Bottino et al, J Exp Med 2003; 198:557-567), блокирующим галектин-9 антителом 9M3-1 (10-50 мкг/мл; Biozol, Eching, Germany) или без добавления антитела в течение 2 ч. Через 2 ч в культуру добавляли 100-500 пг/мл AMG330.

Через 24 ч клеточную смесь окрашивали 7-AAD и анализировали методом проточной цитометрии, используя FACSCalibur и программное обеспечение CellQuestPro (BD Biosciences). Проводили гейтинг клеток-мишеней ОМЛ на основании окрашивания зеленым красителем CellTracker™ Green CMFDA. Процент мертвых клеток определяли как долю 7-AAD-положительных клеток в пределах группы клеток-мишеней.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтической композиции, содержащей ингибитор против CD112 (нектин-2, PVRL2), CD155 (PVR) и/или TIGIT, для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), причем ингибитор представляет собой антитело, которое специфически связывается с CD112, CD155 и/или TIGIT, и причем фармацевтическая композиция дополнительно содержит связывающую молекулу на основе биспецифи-

ческого одноцепочечного Fv (scFv) антитела, которая привлекает Т-клетки и содержит CD3ε-связывающий домен и дополнительный связывающий домен, нацеленный на поверхностную молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD33, CD19 и Flt3.

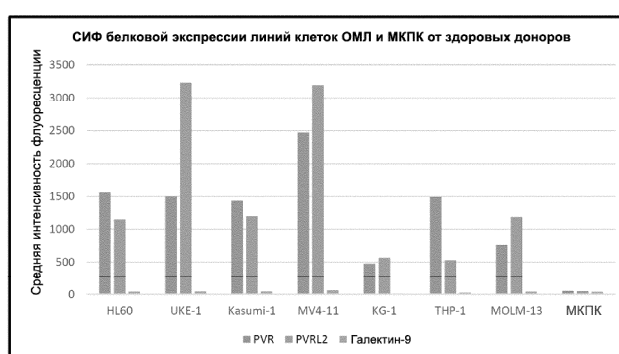
2. Применение по п.1, в котором указанный ингибитор против CD112 ингибирует взаимодействие между CD112 и TIGIT, или в которой указанный ингибитор против CD155 ингибирует взаимодействие между CD155 и TIGIT, или в которой указанный ингибитор против TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD112, или в которой указанный ингибитор против TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155.

3. Применение по п.1, в котором указанный ингибитор против CD112 снижает экспрессию CD112.

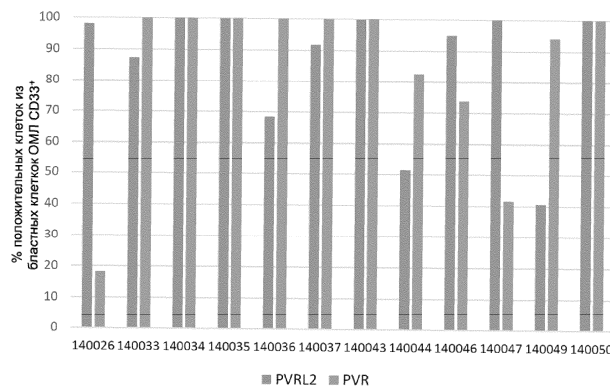
4. Применение по п.1, в котором указанный ингибитор против CD155 снижает экспрессию CD155.

5. Применение по п.1, в котором указанный ингибитор против TIGIT снижает экспрессию TIGIT.

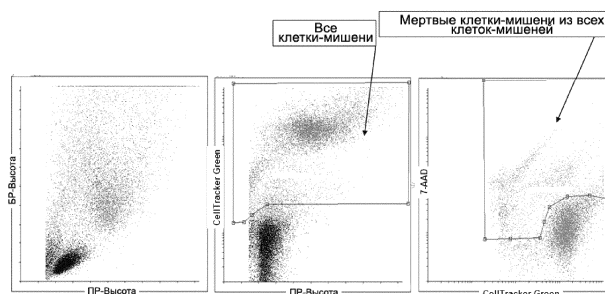
6. Применение по п.1, в котором конструкция антитела, которая привлекает Т-клетки и содержит CD3ε-связывающий домен и дополнительный связывающий домен, нацеленный на поверхностную молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD33, CD19 и Flt3, имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 15-37.



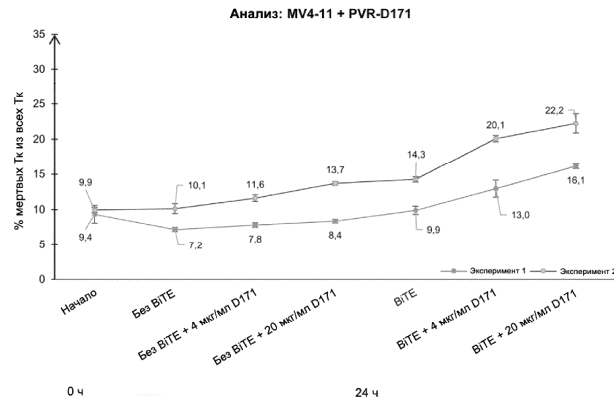
Фиг. 1



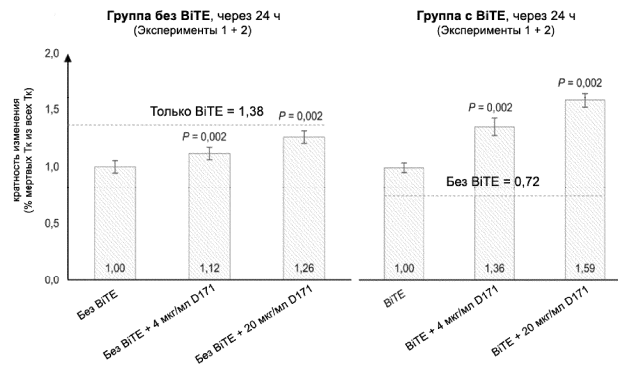
Фиг. 2



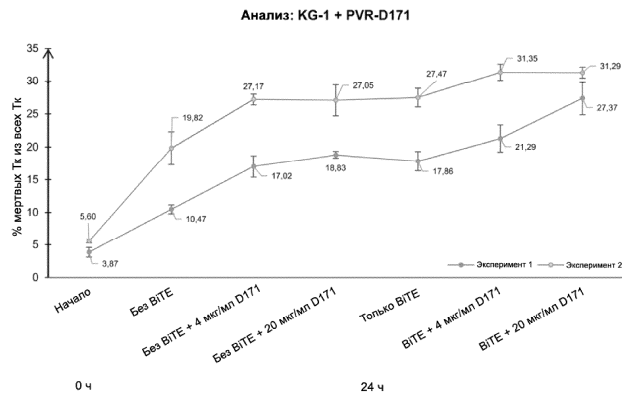
Фиг. 3



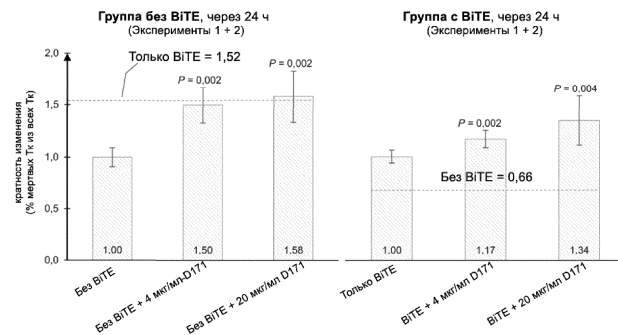
Фиг. 4



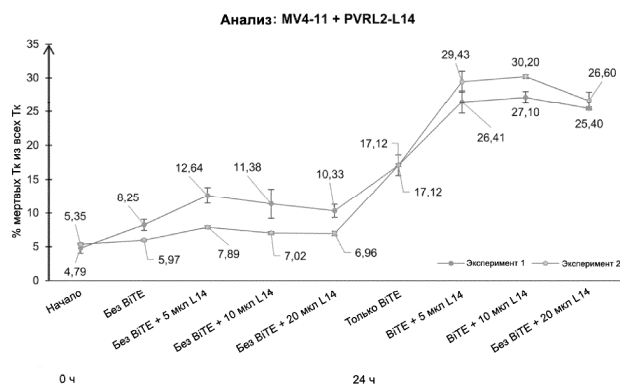
Фиг. 5



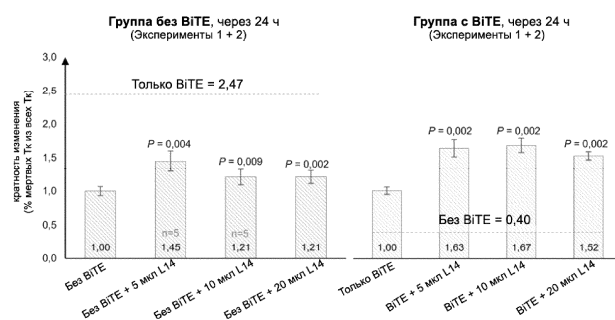
Фиг. 6



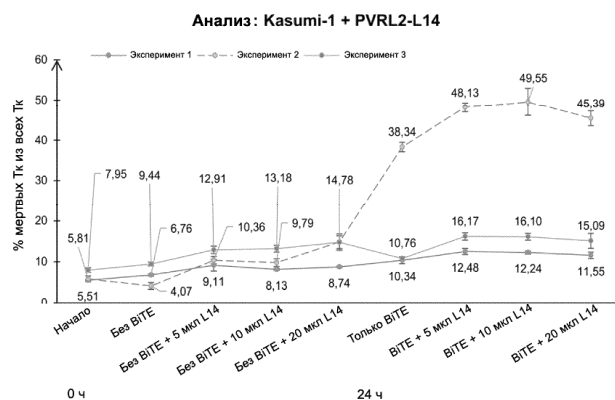
Фиг. 7



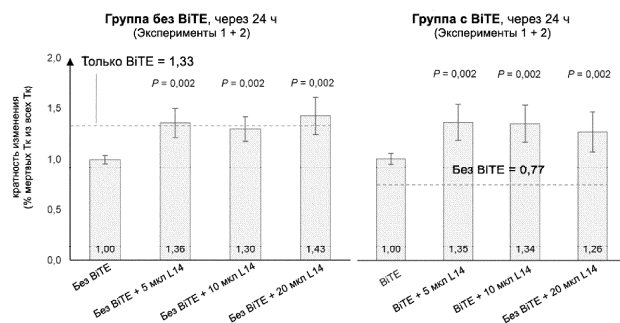
Фиг. 8



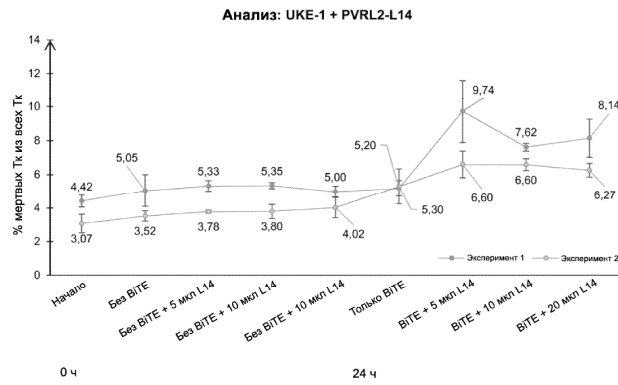
Фиг. 9



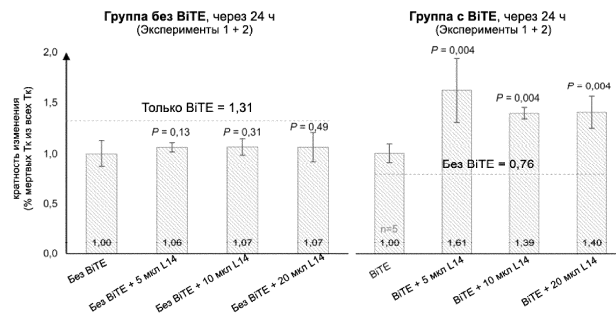
Фиг. 10



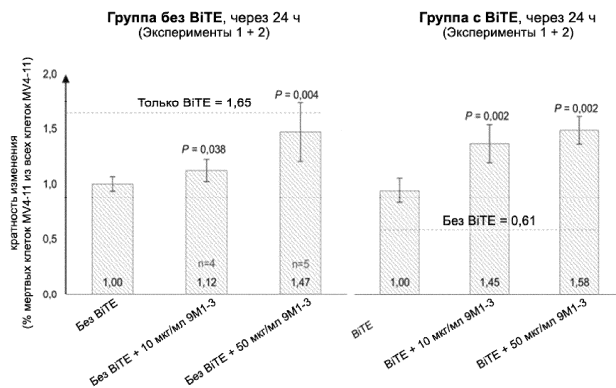
Фиг. 11



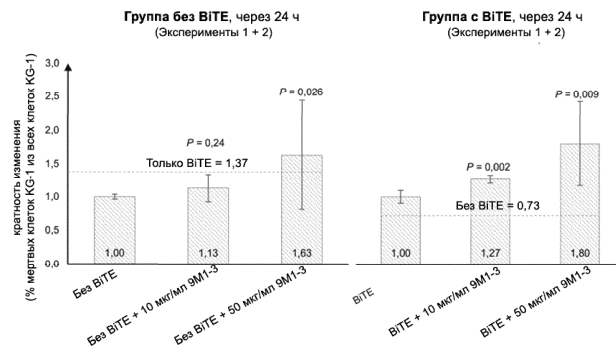
Фиг. 12



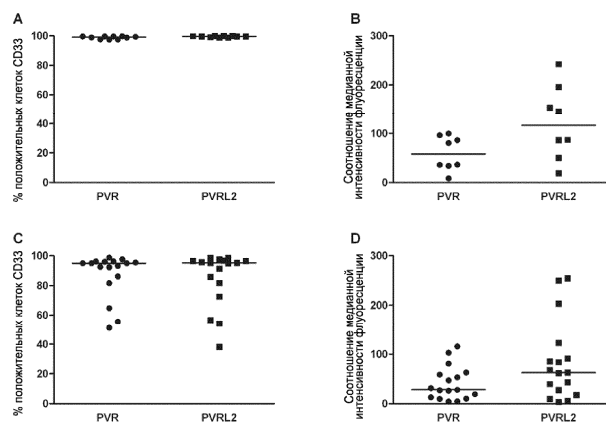
Фиг. 13



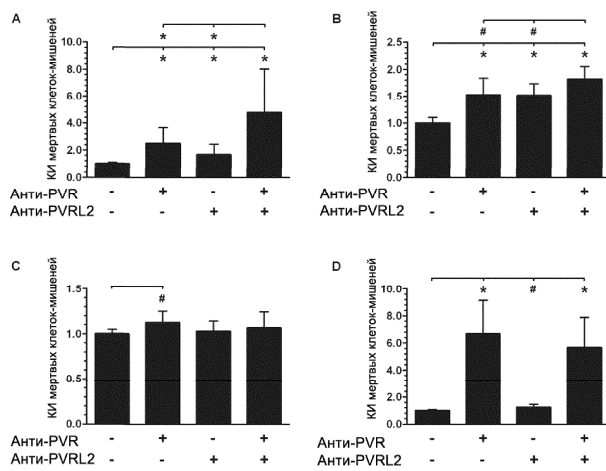
Фиг. 14



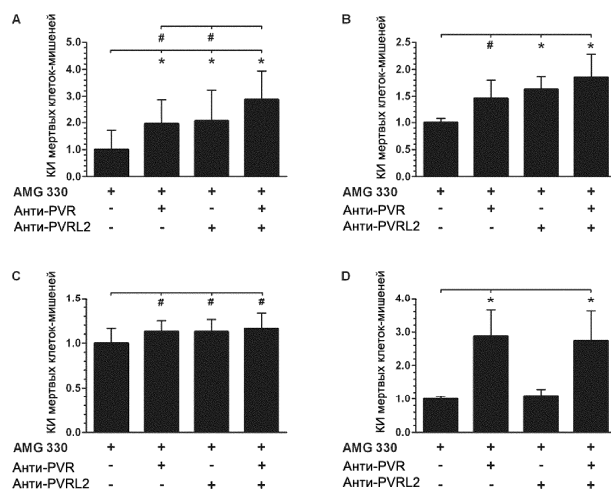
Фиг. 15



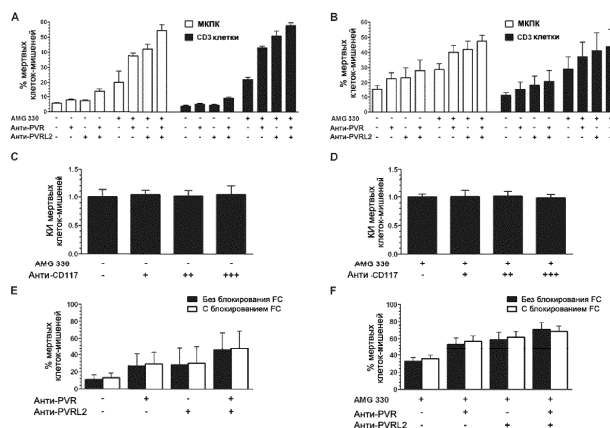
Фиг. 16



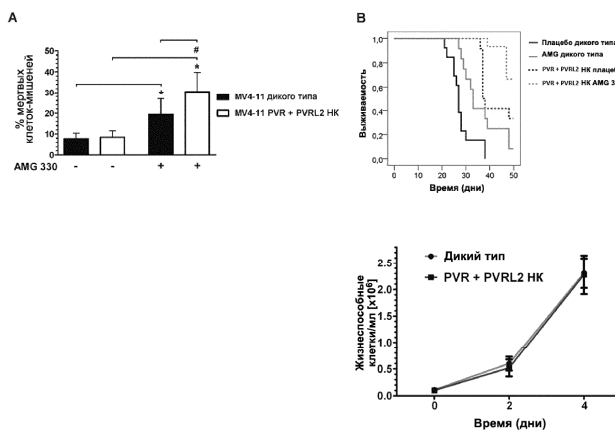
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



ФИГ. 20

A

PVR (NCBI Ref Seq NM_006505.3)

Цепевая область РМБ

ДЛ последовательности CTGAGATGTTTGGGGTGTGGAGTAGGAAGAAG Белок дельта тета (417 AA)

PVR.HK.Predictor #1 CTGAGATGTTTGGGGTGTGGAGTAGGAAGAAGAAG Предсказанный стоп-кодон Ученый белок (N-114)

PVR.HK.Predictor #2 CTGAGATGTTTGGGGTGTGGAGTAGGAAGAAGAAG Предсказанный стоп-кодон Ученый белок (N-116)

PVR.HK.Predictor #3 CTGAGATGTTTGGGGTGTGGAGTAGGAAGAAG Предсказанный стоп-кодон Ученый белок (N-115)

B

PVRL2 (NCBI Ref Seq NM_001042724.1)

РМБ Цепевая область (обратно-комплементарная ориентация)

ДЛ последовательности CATCGGCCGCGCCGCTGCCTCTGCTGCTGAGATGTCGCGCAGCGGCGCTGCTGCTGCGCGCTGCTGCTG Белок дельта тета (538 AA)

PVRL2.HK.Predictor #1 CATCGGCCGCGCCGCTGCCTCTGCTGCTGAGATGTCGCGCAGCGGCGCTGCTGCTGCGCGCTGCTGCTG Предсказанный стоп-кодон Ученый белок (N-175)

PVRL2.HK.Predictor #2 CATCGGCCGCGCCGCTGCCTCTGCTGCTGAGATGTCGCGCAGCGGCGCTGCTGCTGCGCGCTGCTGCTG Удаление AC 3-21, вставка 2 пултиновой кислоты

PVRL2.HK.Predictor #3 CATCGGCCGCGCCGCTGCCTGCTGCTGCTGAGATGTCGCGCAGCGGCGCTGCTGCTGCGCGCTGCTGCTG Предсказанный стоп-кодон Ученый белок (N-147)

ФИГ. 21