

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043336**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.15

(21) Номер заявки
201691323

(22) Дата подачи заявки
2014.12.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) АНТИ-VISTA АНТИТЕЛА И ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ИММУНИТЕТА И ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 61/920,695; 62/085,086

(32) 2013.12.24; 2014.11.26

(33) US

(43) 2016.11.30

(86) PCT/IB2014/002868

(87) WO 2015/097536 2015.07.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКА НВ
(BE)

(72) Изобретатель:
Снайдер Линда, Пауэрс Гордон (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Дементьев В.Н., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)

(56) WO-A2-2011120013

WANG LI ET AL.: "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 14 MAR 2011, vol. 208, № 3, 14 March 2011 (2011-03-14), p. 577-592, XP002738331, ISSN: 1540-9538, table 10

WOLFF ANTONIO C ET AL.: "AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY/COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS GUIDELINE RECOMMENDATIONS FOR HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 TESTING IN BREAST CANCER", ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE, COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS, US, vol. 131, № 1, 1 January 2007 (2007-01-01), p. 18-43, XP008077476, ISSN: 0003-9985, the whole document

LADJEMI MAHA ZOHRA ET AL.: "Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY : CII SEP 2010, vol. 59, № 9, September 2010 (2010-09), p. 1295-1312, XP002741123, ISSN: 1432-0851, p. 1302

(57) Изобретение относится к новым антителам или фрагментам, которые связываются с V-доменом Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), а также способам их получения и применения. Способы применения включают в себя способы лечения рака, включая лейкозы, лимфомы, плотные опухоли и меланомы.

B1

043336

043336 B1

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке № 61/920695, поданной 24 декабря 2013 г., и предварительной заявке № 62/085086, поданной 26 ноября 2014 г. Все сведения вышеуказанных заявок включены в настоящую заявку посредством ссылок.

Уровень техники

Экспрессия негативных регуляторов иммунных контрольных точек раковыми клетками или иммунными клетками в микроокружении опухоли может подавлять иммунный ответ хозяина против опухоли. Для эффективной борьбы с раком желательнее блокировать опухолеспецифичную супрессию иммунного ответа хозяина. Соответственно существует потребность в новых и эффективных терапевтических средствах, которые ингибируют негативные регуляторы иммунных контрольных точек в микроокружении опухоли, которые подавляют противоопухолевые иммунные ответы.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител, включающих в себя антигенсвязывающий участок, который связывается с V-доменом Ig супрессора T-клеточной активации (VISTA). VISTA представляет собой регулятор контрольной точки, который негативно подавляет иммунный ответ. См. Wang et al., "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses", J. Exp. Med., 208(3):577-92 (2011). Он экспрессируется на нормальных нейтрофилах, моноцитах и субпопуляции T-клеток человека. Кроме того, клетки яванского макака экспрессируют VISTA аналогично нормальным человеческим клеткам. VISTA также экспрессируется в клетках периферической крови людей, больных раком. Связывание антитела или фрагмента антитела с VISTA модулирует или усиливает иммунный ответ. Фрагмент антитела может включать, например, Fab, F(ab')₂ или scFv фрагмент антитела. Антитело или фрагмент антитела может содержать константный участок антитела. Антитело или фрагмент антитела может связываться с VISTA, который экспрессировался на гемопоэтической клетке, например, миелоидной клетке и/или лимфоците, моноците или нейтрофиле, T-клетке, естественных клетках-киллерах (NK), T-клетках с функциями естественных киллеров (NKT), опухолевой клетке и/или микроокружении опухоли (TME). Микроокружение опухоли представляет собой клеточную среду опухоли. Она может включать в себя близлежащие иммунные клетки, фибробласты, кровеносные сосуды, другие клетки, сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс.

Антитело и фрагмент антитела может включать в себя один или несколько гипервариабельных участка (CDRs) тяжелой цепи и/или одну или несколько CDRs легкой цепи, включающей одну или несколько CDRs (например, все три тяжелых цепи CDRs, все 3 легких цепи CDRs, или все 6 CDRs) любого из анти-VISTA антител, описанных в настоящей заявке, включая антитела, обозначенные VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) и VSTB60 (S47). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или их фрагменты выбраны из группы, состоящей из VSTB112, VSTB95, VSTB116, VSTB50, VSTB53 и VSTB60. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело или фрагмент включает один или несколько CDRs тяжелой цепи и один или несколько CDRs легкой цепи любого из анти-VISTA антител, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или фрагмент антитела может дополнительно включать по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь любого из анти-VISTA антител, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела включает по меньшей мере одну тяжелую цепь, включающую последовательность вариабельного участка тяжелой цепи, и/или по меньшей мере одну легкую цепь, включающую последовательность вариабельного участка легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело включает человеческий каркасный участок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой бивалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фрагмент представляет собой анти-VISTA связывающий элемент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CDRs тяжелой цепи антитела представлен в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, а CDRs легкой цепи представлен в SEQ ID NO: 4, 5 и 6. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные последовательности вариабельного участка тяжелой цепи и легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

Настоящее изобретение также включает анти-VISTA антитела, которые являются в сущности аналогичными антителам, описанным в настоящем изобретении. Например, в одном варианте осуществления изобретения, антитело или фрагмент включает VH домен антитела, включающий CDR1 VH, обладающий аминокислотной последовательностью, которая является по существу аналогичной SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, обладающий аминокислотной последовательностью, которая является по существу аналогичной SEQ ID NO: 2, и VH CDR3, обладающий аминокислотной последовательностью, которая является по существу аналогичной SEQ ID NO: 3, и которое дополнительно включает VL домен антитела, включающий CDR1 VL, обладающий аминокислотной последовательностью, которая является по существу аналогичной SEQ ID NO: 4, CDR2 VL, обладающий аминокислотной последовательностью, которая является по существу аналогичной SEQ ID NO: 5, и CDR3 VL, обладающий аминокислотной последовательностью, которая является по существу аналогичной SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение также относится к анти-VISTA антителам, которые конкурентно ингиби-

руют, или конкурируют за связывание с анти-VISTA антителами, описанными в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-VISTA антитела представляют собой часть конъюгата, например, конъюгата, который включает цитотоксическую молекулу или другое вещество, описанное в настоящем изобретении. Такие молекулы хорошо известны в области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела включает человеческий константный участок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела является специфичным для эпитопа VISTA, например, в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела связывается с эпитопом VISTA с аффинностью по меньшей мере 1×10^{-7} л/моль, например по меньшей мере 1×10^{-8} л/моль, например по меньшей мере 1×10^{-9} л/моль.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модуляция иммунного ответа включает увеличение в $CD45^+$ лейкоцитов, $CD4^+$ Т-клеток и/или $CD8^+$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модуляция иммунного ответа включает усиление выработки (например, Т-клеткой) цитокинов (например, $IFN\gamma$, IL-10, $TNF\alpha$, IL-17), усиление Т-клеточного ответа и/или модулированную экспрессию Foxp3.

Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящей заявке (например, анти-VISTA антитело), и фармацевтически приемлемый носитель, растворитель или наполнитель. Например, композиция может включать в себя антагонист VISTA, содержащий антитело или фрагмент такого антитела, включающее антигенсвязывающую область, которая связывается с VISTA, и вакцину (такую как вакцина на основе вирусного вектора, бактериальную вакцину, ДНК вакцину, ДНК вакцину, пептидную вакцину). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию и связывание антитела или фрагмента антитела с VISTA модулирует или усиливает иммунный ответ.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения рака, включающим введение индивидууму (например, млекопитающему, например человеку или нечеловекоподобному животному), нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одного антитела, фрагмента антитела или композиции, описанные в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела связывается с VISTA, тем самым модулируя или усиливая иммуногенный ответ на рак. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой лейкоз, лимфому, миелодиспластический синдром и/или миелому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой любой вид или тип лейкоза, в том числе лимфоцитарный лейкоз или миелогенный лейкоз, такой как, например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелоцитарный (миелогенный) лейкоз (AML), хронический гранулоцитарный лейкоз (CMML), лейкоз ворсистых клеток, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лейкоз из больших зернистых лимфоцитов, или Т-клеточный лейкоз взрослых. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лимфома представляет собой гистiocитарную лимфому, а в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой плотную опухоль, например, меланому или рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рак легких (например, немелкоклеточную карциному легких (NSCLC)). Некоторые способы лечения дополнительно включают в себя введение вакцины (такой как вакцина на основе вирусного вектора, бактериальной вакцины, вакцины на основе клеток, ДНК вакцины, РНК вакцины, пептидной вакцины или белковой вакцины). Настоящее изобретение также относится к способу подавления роста опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного антитела или фрагмента антитела или композиции, описанные в настоящем изобретении. Композиция, антитело или фрагмент или другие фармацевтические вещества (например, вакцина) может вводиться любым парентеральным или непарентеральным способами, например, внутривенно (IV), подкожно (SQ) или перорально (PO). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, антитело или фрагмент вводят каждые три месяца, еженедельно, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения другие фармацевтические или терапевтические вещества вводят совместно, до, в ходе или после антител, фрагментов или композиций, описанных в настоящем изобретении. Совместно вводимое вещество может быть введено таким же путем как антитело, фрагмент или композиция, или иным путем. Настоящее изобретение также включает способы получения антител, фрагментов или композиций, например, способ получения антитела или фрагмента, описанного в настоящем изобретении, включающий культивирование клеток-хозяев в условиях для получения указанного антитела. Способ может дополнительно включать выделение антитела. Настоящее изобретение

также относится к нуклеиновым кислотам, например, выделенным нуклеиновым кислотам, которые включают нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела и фрагменты, экспрессионные векторы, включающие в себя такие нуклеиновые кислоты, например, функционально связанные с промото-ром, и клетки-хозяева, трансформированные с таким экспрессионным вектором. Настоящее изобретение также относится к наборам и готовым изделиям, включающим композицию, содержащую анти-VISTA антитело и контейнер, и дополнительно содержит листовку-вкладыш или этикетку, указывающую, что композиция может быть использована для лечения рака.

Настоящее изобретение также относится к выделенному антителу или фрагменту такого антитела, включающее антигенсвязывающую область, которая связывается с V-доменом Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), где антитело включает VH домен антитела, содержащий CDR1 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR2 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26 и CDR3 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, и который дополнительно включает VL домен антитела, содержащий CDR1 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, и CDR3 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела включает один или несколько гуманизованный или человеческий каркасный участок. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, антитело или фрагмент антитела включает VH домен антитела, который содержит SEQ ID NO: 37 и/или VL домен антитела, содержащий SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело включает константный участок тяжелой цепи (например, константный участок человеческой тяжелой цепи) и/или константный участок легкой цепи (например, константный участок человеческой легкой цепи, такой как константный участок легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 56). Предпочтительно, константный участок тяжелой цепи представляет собой константный участок тяжелой цепи IgG1 (например, константный участок тяжелой цепи IgG1 представлен в SEQ ID NO: 61). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, константный участок тяжелой цепи IgG1 был изменен для усиления протеазной резистентности антитела. Примером константного участка тяжелой цепи IgG1, который был изменен для усиления протеазной резистентности, является константный участок тяжелой цепи IgG1, представленный в SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела включает тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56; или тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 61, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело или фрагмент антитела экспрессируется в клетке, в которой дефицит фукозилирования ферментов (например, клетка яичника китайского хомячка (CHO), в которой дефицит фукозилирования ферментов).

Настоящее изобретение также относится к композиции, включающей в себя антитело или фрагмент этого антитела, содержащее VH домен антитела, включающий CDR1 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR2 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, и CDR3 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, и которое дополнительно включает VL домен антитела, содержащий CDR1 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, и CDR3 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и фармацевтически приемлемый носитель, растворитель или наполнитель.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, изобретение относится к способу лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента этого антитела, которое связывается с V-доменом Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), причем антитело включает VH домен антитела, содержащий CDR1 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR2 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, и CDR3 VH, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, и которое дополнительно включает VL домен антитела, содержащий CDR1 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, и CDR3 VL, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, рак представляет собой рак легких. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, рак легких представляет собой мелкоклеточную карциному легких (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает введение второй противоопухолевой терапии (например, операции, химиотерапии, лучевой терапии, биологической терапии, иммуномодулирующей терапии и их сочетания).

Настоящее изобретение также обеспечивает антитело или фрагмент этого антитела, включающее антигенсвязывающую область, которая связывается с V-доменом Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), причем антитело связывается с конформационным эпитопом в VISTA (например, человеческого VISTA). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конформационный эпитоп включает или присутствует в пределах остатков 103-111 (NLTLDSGL (SEQ ID NO: 62)) и 136-146

(VQTGKDAPSNC (SEQ ID NO: 63)) человеческих VISTA (SEQ ID NO: 46). В другом варианте осуществления настоящего изобретения, конформационный эпитоп включает или присутствует в пределах остатков 24-36 (LLGPVDKGGHDVTF (SEQ ID NO: 64)), 54-65 (RRPIRNLTFQDL (SEQ ID NO: 65)) и 100-102 (TMR) человеческих VISTA (SEQ ID NO: 46). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, конформационный эпитоп включает аминокислотные остатки в FG петле человеческих VISTA (SEQ ID NO: 46).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу усиления иммунного ответа у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества антител, которые связываются с V-доменом Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), или фрагмента этих антител, включающего антигенсвязывающую область, которая связывается с VISTA, тем самым усиливая иммунный ответ на рак. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, иммунный ответ представляет собой противоопухолевый иммунный ответ. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, изобретение предлагает способ вызывать биологический ответ у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела, которое связывает V-домен Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), или фрагмента этого антитела, включающего антигенсвязывающую область, которая связывается с VISTA, тем самым усиливая иммунный ответ на рак. Примеры биологических ответов включают активацию моноцитов; индукцию пролиферации Т-клеток и секрецию цитокинов; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) клеток, экспрессирующих VISTA; и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) клеток, экспрессирующих VISTA.

Краткое описание чертежей

Патент или комплект материалов заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный цветным. Копии данного патента или комплекта материалов заявки с цветным чертежом будут представлены по требованию.

На фиг. 1A-1C представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на TF1 AML клетках, экспрессия белка VISTA с помощью проточной цитометрии показана в TF-1 AML клеточной линии.

На фиг. 2A-2E представлены графики, показывающие окрашивание и стратегия гейтирования для установления человеческих миелоидных и лимфоидных субпопуляций.

На фиг. 3A-3G представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на человеческих миелоидных и лимфоидных субпопуляциях от одного здорового донора.

На фиг. 4 представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на человеческих миелоидных и лимфоидных субпопуляциях от нескольких здоровых нормальных доноров.

На фиг. 5A и 5B представлен график, показывающий окрашивание и стратегия гейтирования для определения экспрессии VISTA на человеческих моноцитах и макрофагах.

На фиг. 6A-6C представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на человеческих моноцитах и макрофагах.

На фиг. 7A-7E представлены графики, показывающие окрашивание и стратегия гейтирования для определения экспрессии VISTA на человеческих Т и NK-клеточных субпопуляциях.

На фиг. 8A-8G представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на человеческих Т- и NK-клеточных субпопуляциях от одного здорового нормального донора.

На фиг. 9 представлен график, показывающий экспрессию VISTA на человеческих Т- и NK-клеточных субпопуляциях от нескольких нормальных доноров.

На фиг. 10A-10D представлены графики, показывающие окрашивание и стратегия гейтирования для определения экспрессии VISTA на субпопуляциях человеческих дендритных клеток.

На фиг. 11A-11C представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на субпопуляциях человеческих дендритных клеток и базофилах от одного здорового донора.

На фиг. 12 представлены графики, показывающие экспрессию VISTA на субпопуляциях человеческих дендритных клеток и базофилах от нескольких здоровых нормальных доноров.

На фиг. 13A-13D представлен анализ экспрессии VISTA на клетках периферической крови здорового человека. Профиль экспрессии VISTA на клетках периферической крови здорового человека с применением анализа многоцветной проточной цитометрии: образцы цельной крови от 2 различных индивидуумов были проанализированы на экспрессию VISTA на (фиг. 13A) моноцитах ($SSC^{lo}CD11b^{hi}CD14^{hi}CD16^{-ve}CD33^{+ve}HLA-DR^{+ve}CD19^{-ve}$) (фиг. 13B) нейтрофилах ($SSC^{hi}CD177^{+}CD11b^{hi}CD14^{lo}CD16^{+ve}CD33^{+ve}HLA-BR^{-ve}CD19^{-ve}$). Мононуклеары периферической крови были выделены с применением градиента Фиколла для анализа (фиг. 13C) $CD4^{+}$ Т-клеток ($CD3^{+ve}CD4^{+ve}$), и (фиг. 13B) $CD8^{+}$ Т-клеток ($CD3^{+ve}CD8^{+ve}$).

На фиг. 14A-14C представлен анализ экспрессии VISTA на клетках периферической крови от пациента, болеющего раком легких, и здорового донора в качестве контроля. Профиль экспрессии VISTA на клетках периферической крови пациента, болеющего раком легких, с применением анализа многоцветной проточной цитометрии: показательный плот FACS (фиг. 14A) представлен от одного индивидуума. Мононуклеары периферической крови были выделены с применением Фиколла и проанализированы на экспрессию VISTA на (фиг. 14B) моноцитах ($CD14^{+}CD11b^{+}CD33^{+}HLA-BR^{+}CD15^{-}$) и (фиг. 14C) миело-

идных супрессорных клетках (CD14⁻ CD11b⁺ CD33-HLABR-CD15⁺ CD146⁺).

На фиг. 15A-15C представлен профиль экспрессии VISTA в клетках периферической крови от пациента, болеющего раком толстой кишки, с применением анализа многоцветной проточной цитометрии: показательный плот FACS (фиг. 15A) представлен от одного индивидуума. Мононуклеары периферической крови были выделены с применением Фиколла и проанализированы на экспрессию VISTA на (фиг. 15B) моноцитах (CD14⁺ CD11b⁺ CB33⁺ HLABR⁺ CD145⁻) и (фиг. 15C) миелоидных супрессорных клетках (CD14⁻ CD11b⁺ CD33-HLABR-CD15⁺ CD146⁺).

На фиг. 16A, 16B представлен профиль экспрессии VISTA на клетках периферической крови яванского макака с применением анализа многоцветной проточной цитометрии: была исследована цельная кровь от 4 различных макаков на экспрессию VISTA на (фиг. 16A) моноцитах (SSC^{lo}CD11b^{hi}CD14^{hi}HLA-BR^{hi}CD16^{-ve}CD19^{-ve}) и (фиг. 16B) нейтрофилах CD11b^{hi}CD14^{lo}HLA-DR^{-ve}CD16^{-ve}CD19^{-ve}. Мононуклеары периферической крови от трех макаков были выделены с применением градиента Фиколла для анализа (фиг. 16C) CD4⁺ Т-клеток (TCR α/β ^{+ve}CD4^{+ve}) и (фиг. 16D) CD8⁺ Т-клеток (TCR α/β ^{+ve}CD8^{+ve}).

На фиг. 17 представлен график, показывающий абсолютные значения экспрессии РНК VISTA клеточных линиях Неме.

На фиг. 18 показаны мышинные клетки A20, которые стабильно трансфицированы с либо GFP либо человеческим VISTA. Они были инкубированы с пептидом овальбумина и с DO11.10 Т-клетками. Экспрессию CD25 Т-клетками измеряли через 24 ч после начала инкубации. Клетки A20-huVISTA подавляют экспрессию CD25 Т-клетками, но эти показания значительно восстанавливаются путем инкубации с VSTB95.

На фиг. 19A-19F представлены графики, показывающие результаты ИФА человеческих VISTA.

На фиг. 20A-20F представлены результаты FACS человеческих VISTA, показывающие связывание анти-VISTA антител с клетками, экспрессирующими человеческий VISTA.

На фиг. 21A-21D представлено исследование разбавления 6 кандидатов анти-VISTA антител в реакции смешанной культуры лимфоцитов от 30 мг/мл до 0.0 мг/мл.

На фиг. 22A и 22B представлены исследования разведения 6 кандидатов анти-VISTA антител в анализе SEB (единичные СРМ импульсы и концентрации IFN-g) от 30 до 0.0 мг/мл.

На фиг. 23 представлена сенсограмма плота с применением VSTB85 анти-VISTA антитела, покрытых на чипе Proteon SPR, и белка VISTA с указанными конкурентами, бегущими по чипу (конкуренты перечислены в таблице).

На фиг. 24 представлен экспериментальный дизайн для модели мышинной опухоли MB49 мочевого пузыря.

На фиг. 25A и 25B показан рост опухоли MB49 у C57B1/6 мышей женского пола. Графики показывают рост опухоли у отдельных мышей, которым вводили анти-мышинные VISTA антитела (фиг. 25B) или контрольные IgG (фиг. 25A). На фиг. 26 представлена аминокислотная последовательность человеческого VISTA (SEQ ID NO: 46).

На фиг. 27 представлено множественное выравнивание последовательностей ортологических VISTA.

На фиг. 28 представлены участки человеческих VISTA, связанные с VSTB50 и VSTB60 антителами (сверху) или VSTB95 и VSTB112 антителами (снизу), как определено с помощью HDX.

На фиг. 29 представлен эпитоп VISTA, связанный с VSTB112. VISTA представлен в карикатурном виде с помеченными нитями (сверху). Остатки, имеющие по меньшей мере один атом в пределах 5 Å VSTB112 в комплексе, окрашены синим. Синие и оранжевые области указывают на разрыв цепи, а голубые и зелеными областями отмечены N- и C-концы VISTA структуры соответственно. Последовательность конструкции VISTA применяется в определении структуры (снизу). Круги под последовательностью применялись для обозначения остатков, которые составляют только основную цепь, контактирующую с VSTB112, треугольниками обозначают контакт на боковой цепи, а квадратами обозначают контакт на боковой цепи, что приводит к либо взаимодействию водородной связи, либо ионной связи, как рассчитывается с помощью PISA. Области окрашены для обозначения CDR, имеющего наибольшее число атомов, связывающих данный остаток с CDR, цветами, указанными на фиг. 29. Вторичные структурные элементы, как обозначены в программе MOE, с желтыми стрелками, обозначающие β-нити, и красные прямоугольники, обозначающие α-спирали.

На фиг. 30 представлен паратоп VSTB112. Антиген VISTA представлен в иллюстрации и VSTB112 VISTA в пределах 5 ангстрем (Å) показан на поверхности с цветами, используемыми для обозначения идентичности CDR, в соответствии с последовательностью ниже (сверху). Контактное каркасных остатков, прилегающих к CDR, окрашены аналогично соответствующей последовательности CDR (нижняя часть) Fv участка VSTB112. Окрашенный задний план указывали CDRs в соответствии с определениями Kabat. Круги ниже последовательности применялись для обозначения остатков, которые составляют основную цепь, контактирующую с VISTA, треугольниками обозначают контакт на боковой цепи, а квадраты обозначают контакт на боковой цепи, приводящий к взаимодействию либо водородной связи, либо ионной связи, как рассчитывается с помощью PISA.

На фиг. 31 представлено сравнение участков эпитопа, определенных с помощью кристаллографии и водород-дейтериевого обмена (HDX). Последовательность конструкции VISTA применяли в определении структуры. Круги ниже последовательности применяли для обозначения остатков, которые составляли только основную цепь, контактирующую с VSTB112, треугольники обозначают контакт на боковой цепи, а квадраты обозначают контакт на боковой цепи, приводящий к взаимодействию либо водородной связи, либо ионной связи, как рассчитывается с помощью PISA.

На фиг. 32 представлена активация CD14⁺ моноцитов в целых PBMC с помощью VSTB174 (полученного от VSTB112). В каждой части эксперимента клетки инкубировали с PBS, контрольные IgG1 антитела или VSTB174 при 1, 0.1 или 0.01 мкг/мл. На левой панели показаны CD80 MFI; на правой панели показаны HLA-DR MFI (показаны исследования двух доноров с достоверными результатами).

На фиг. 33 представлены графики, показывающие активность ADCC VSTB174, направленную против K562-VISTA клеток.

На фиг. 34 представлены графики, показывающие активность ADCP VSTB174, направленную против K562-VISTA клеток. Изображенные оба антитела имеют одинаковые Fab, но VSTB174 имеет Fc IgG1 и VSTB140 имеет Fc молчащего IgG2.

На фиг. 35 представлен график, показывающий фагоцитоз, опосредованный VSTB174, VSTB149 или VSTB140 mAbs против K562-VISTA. Каждую mAb исследовали с 7 половиной логарифма доз в пределах от 0.0008 до 0.56 мкг/мл.

На фиг. 36 представлен график, показывающий фагоцитоз, опосредованный VSTB174, VSTB149 или VSTB140 mAbs против K562 клеток миеломной клеточной линии. Каждое mAb исследовали с 7 половиной логарифма доз в пределах от 0.0008 до 0.56 мкг/мл.

На фиг. 37 представлено исследование эффективности опухоли MB49, оцениваемой VSTB123 1, 5, 7.5 и 10 мг/кг у VISTA-KI мышей женского пола. Объемы опухолей составляли приблизительно 50 мм³, когда начинали дозирование на 6 день после имплантации. VSTB123 представляют собой Fab VSTB112, трансплантированные в мышечный остов Fc и связывались с человеческими VISTA в VISTA-KI мышцах.

На фиг. 38 представлен график, показывающий, что CD14⁺ клетки, экспрессирующие высокие/промежуточные уровни VISTA, обнаружены в 13/13 образцах рака легких, а также удаленной легочной ткани и периферической крови пациентов.

На фиг. 39 показано ИНС окрашивание для VISTA в раке легких с применением GG8.

Подробное описание изобретения

Ниже приводится описание примерных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к антителам к новому лиганду семейства иммуноглобулинов, предназначенному V-домену иммуноглобулина супрессора T-клеточной активации (VISTA) (Genbank: JN602184) (Wang et al., 2010, 2011). VISTA имеет гомологию к PD-L1, но показывает уникальный профиль экспрессии гена, который ограничен в гемопозитическом отделении. В частности, VISTA конститутивно и в высшей степени экспрессируется на CD11b^{high} миелоидных клетках, и экспрессируется на более низких уровнях на CD4⁺ и CD8⁺ T-клетках. Доля человеческих гомологов приблизительно 85% гомологии с мышинными VISTA и обладают сходным профилем экспрессии генов (Lines et al., Cancer Research 74:1924, 2014). VISTA экспрессируется на антиген-презентирующих клетках (APCs), подавляя пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток и выработку цитокинов посредством родственного рецептора независимо от PD-1. В пассивной EAE (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит) модели заболевания, VISTA специфические моноклональные антитела усиливают T-клеточнозависимые иммунные ответы и обостряют заболевание. VISTA сверхэкспрессируется на опухолевых клетках с нарушением защитного противоопухолевого иммунитета у опухоленесущих хозяев. Исследования человеческих VISTA подтвердили его подавляющую функцию на человеческие T-клетки (Lines et al., Cancer Research, 74:1924, 2014, Studies from Flies et al. also identified VISTA (named PD-1H) as a potent immune suppressive molecule (Flies et al., 2011). VISTA описан более подробно в 20130177557 A1 и патентах США № 7919585 и 8236304, все из которых включены в настоящее описание посредством ссылки в их полном объеме.

VISTA представляет собой новый негативный регулятор контрольной точки, который подавляет иммунные ответы. Как описано в примере 12 настоящей заявки, лечение с VISTA-специфическими моноклональными антителами в мышинных моделях опухолей показало полностью изменение подавляющего характера иммунного микроокружения опухоли и усиление защитного противоопухолевого иммунитета, таким образом, показывая потенциал моноклонального антитела VISTA в качестве нового терапевтического средства для иммунотерапии рака.

Антитела и фрагменты.

Термин "антитело" означает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAbs), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела и антиидиотипические (анти-Id) антитела, а также фрагменты, участки и их производные, полученные любым известным способом, такими как, но не ограничиваясь ими, ферментативное расщепление, пептидный синтез или рекомбинантные методы. Анти-VISTA антитела по настоящему изобретению способны связывать участки VISTA, которые модулируют, регулируют или усиливают иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения антитела конкурентно ингибируют одну или несколько анти-VISTA антител, описанных в настоящем описании. Способы для определения того, два или более антител конкурируют за связывание с той же мишенью, известны из уровня техники. Например, конкурентно-связывающий анализ можно применять для установления того, блокирует ли одно антитело связывание другого антитела с мишенью. Как правило, конкурентно-связывающий анализ включает применение очищенного антигена-мишени (например, PD-1), связанного либо с твердым субстратом, либо с клетками, непо меченную исследуемую связывающую молекулу и меченную референсную связывающую молекулу. Конкурентное связывание измеряют с помощью количества меток связывания с твердым субстратом или клетками в присутствии исследуемой связывающей молекулы. Обычно, исследуемая связывающая молекула присутствует в избытке. Как правило, когда конкурирующая связывающая молекула присутствует в избытке, она будет ингибировать специфическое связывание референсной связывающей молекулы с гетерогенным антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конкурентное связывание определяют с помощью анализа конкурентного ингибирования твердофазного ИФА. Поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученных из сыворотки животных, иммунизированных антигеном. Моноклональные антитела содержат по существу однородную совокупность антител специфичных к антигенам, где популяция содержит по существу аналогичные участки связывания эпитопа. Моноклональные антитела могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники. См., например, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); патент США № 4376110; Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); и Harlow and Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), все содержимое которых включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Такие антитела могут быть любого класса иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, GILD и любого их подкласса. Гибридома, производящая моноклональные антитела по настоящему изобретению, может быть культивирована *in vitro*, *in situ* или *in vivo*. Настоящее изобретение также включает фрагменты, определенные участки и их варианты, включая антитела миметики или включающие участки антител, которые копируют структуру и/или функцию антитела или определенного или его участка, в том числе одноцепочечные антитела и их фрагменты. Функциональные фрагменты включают в себя антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с белком VISTA млекопитающих. Например, фрагменты антител, способные связываться с VISTA или его участками, включая, но не ограничиваясь ими, Fab (например, путем расщепления папаина), Fab' (например, путем расщепления пепсина и неполного восстановления) и F(ab')₂ (например, путем расщепления пепсина), fabc (например, путем расщепления плазмина), rFc' (например, путем расщепления пепсина или плазмина), Fd (например, путем расщепления пепсина, неполного восстановления и агрегации), Fv или scFv (например, с помощью молекулярно-биологических методов) фрагменты, включены в настоящее изобретение (см., например, Colligan, *Immunology*, *supra*). Фрагменты антител по настоящему изобретению также включают в себя те, которые описаны в Aaron L., Nelson, *mAbs* 2:1, 77-83 (январь/февраль 2010), содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме. Такие фрагменты могут быть получены путем, например, ферментативного расщепления, синтетическими или рекомбинантными методами, как известно в области техники и/или как описано в настоящей заявке. Антитела могут также быть получены в различных процессированных формах с применением генов антитела, в которых один или более стоп-кодонов были введены до природного стоп-участка. Например, сочетание генов, кодирующих участок F(ab')₂ тяжелой цепи, может быть предназначено для включения последовательностей ДНК, кодирующей домен СН1 и/или шарнир тяжелой цепи. Различные участки антител могут быть соединены друг с другом химически с помощью общепринятых методов или могут быть получены в виде смежного белка с применением методов генетической инженерии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, аминокислотная последовательность цепи иммуноглобулина или его части (например, переменный участок, CDR) имеет приблизительно 70-100% идентичности (например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой диапазон или их значение) к аминокислотной последовательности соответствующей переменной последовательности цепи, описанной в настоящем изобретении. Предпочтительно, 70-100% идентичных аминокислот (например, 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой диапазон или их значение) определяют с применением подходящего компьютерного алгоритма, как известно в данной области техники.

Примеры последовательностей переменных участков тяжелой цепи и легкой цепи приведены в настоящем описании.

Антитела по настоящему изобретению или конкретные их варианты, могут включать любое количество остатков заменимых аминокислот от антитела по настоящему изобретению, где количество выбрано из группы целых чисел, состоящей из 10-100% от количества заменимых остатков в анти-TNF антителе. Необязательно данная подпоследовательность заменимых аминокислот составляет по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200,

210, 220, 230, 240, 250 или более аминокислот в цепи или любой диапазон или их значение. Кроме того, количество таких подпоследовательностей может быть любым целым числом, выбранным из группы, состоящей из от 1 до 20, таким как по меньшей мере 2, 3, 4, или 5.

Как будет понятно специалистам, настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело по настоящему изобретению. Биологически активное антитело обладает специфической активностью по меньшей мере 20, 30 или 40%, и предпочтительно по меньшей мере 50, 60, или 70%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80, 90 или 95-100% от нативного (не синтетического), эндогенного или родственного и известного антитела. Способы исследования и количественных измерений ферментативной активности и субстратной специфичности хорошо известны специалистам в данной области техники.

Значительное сходство относится к соединению, имеющему по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 95%) идентичности и по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 95%) активности от нативного (не синтетического), эндогенного или родственного и известного антитела.

В контексте настоящего описания, термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркас, CL, CH домены (например, CH1, CH2, CH3), шарнир, (VL, VH)) практически не иммуногенные для человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Аналогичным образом, обозначаются антитела приматов (обезьяна, бабуин, шимпанзе и т.п.), грызунов (мыши, крысы и т.п.) и других млекопитающих обозначают такой вид, подкласс, класс, подсемейство, семейство специфических антител. Кроме того, химерные антитела могут включать любое сочетание вышеперечисленных. Такие изменения или варианты необязательны и предпочтительно сохраняют или уменьшают иммуногенность у людей или других видов по сравнению с не модифицированными антителами. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела. Это указывает на то, что человеческое антитело может быть получено с помощью нечеловекоподобного животного или прокариотической или эукариотической клетки, которая способна экспрессировать функционально реаранжированные гены иммуноглобулина человека (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Кроме того, когда человеческое антитело представляет собой одноцепочечное антитело, оно может содержать линкерный пептид, который отсутствует у нативных человеческих антител. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до приблизительно восьми глицина или других аминокислотных остатков, который соединяет переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи. Такие линкерные пептиды считаются человеческого происхождения.

Биспецифические, гетероспецифические, гетероконъюгатные или похожие антитела могут также применяться, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные, антитела, которые имеют связывающую специфичность в отношении по меньшей мере двух различных антигенов. В рассматриваемом случае одна из специфичности связывания для по меньшей мере одного VISTA белка, а другая будет для любого другого антигена. Способы получения биспецифических антител известны из уровня техники.

Рекомбинантное получение биспецифических антител может быть основано на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, где две тяжелые цепи обладают различной специфичностью (Milstein and Cuello, Nature, 305:537 (1983)). См. также WO 93/08829, патенты США № 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986), каждая из которых включены в настоящее описание посредством ссылки в их полном объеме.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, изобретение относится к биспецифическим антителам, нацеленные на VISTA и второго белка-мишени (например, белок иммунных контрольных точек). Примерные биспецифические антитела включают биспецифическое антитело, нацеленное на VISTA и PD-L1 и биспецифическое антитело, нацеленное на VISTA и PD-L2.

Человеческие антитела, которые специфичны для человеческих белков VISTA или их фрагментов, могут быть индуцированы против соответствующего иммуногенного антигена, такого как белок VISTA или его участка (включая синтетические молекулы, такие как синтетические пептиды).

Другие специфические или общие антитела млекопитающих могут быть индуцированы аналогичным способом. Подготовка иммуногенных антигенов и получение моноклональных антител могут осуществляться с применением любого подходящего способа.

Например, гибридомы получают путем слияния подходящей иммортализованной линии клеток (например, линия миеломных клеток таких как, но не ограничиваясь ими, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIIWA, NEURO 2A, или т.п., или гетеромиеломой, их продукты слияния, или любые клетки или слияние клеток, полученная из них, или любая другая подходящая клеточная линия, известная из уровня техники, См., например, www.atcc.org, with antibody-producing cells. Антителопродуцирующие клетки могут включать выделение или клонирование селезенки, периферической крови, лимфы, миндалина или другие иммунные клетки

(например, В клетки), или любые другие клетки, экспрессирующие последовательности константного или переменного или каркасного или гиперпеременного участка (CDR) тяжелой или легкой цепи. Такие антителопродуцирующие клетки могут быть рекомбинантными или эндогенными клетками и могут также быть прокариотическими или эукариотическими (например, млекопитающих, таких как, грызуны, лошади, овцы, козы, бараны, приматы). См., например, Ausubel, *supra*, and Colligan, *Immunology, supra*, chapter 2, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Антителопродуцирующие клетки также могут быть получены из периферической крови или предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов, человека или других подходящих животных, которые были иммунизированы интересующим антигеном. Любая другая подходящая клетка-хозяин может также применяться для экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, специфический фрагмент или его варианты, по настоящему изобретению. Слившиеся клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки могут быть выделены с применением селективных условий культивирования или другими подходящими известными способами, и клонированы путем предельного разведения или клеточного сортирования или других известных способов. Клетки, которые производят антитела с желаемой специфичностью, могут быть выбраны с помощью подходящего анализа (например, твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА)). Могут применяться другие подходящие способы получения или выделения антител с требуемой специфичностью, включающие, но не ограничивающиеся ими, способы, которые применяются для выбора рекомбинантного антитела из библиотеки пептидов или белков (например, но не ограничиваясь ими, бактериофаг, рибосома, олигонуклеотид, РНК, кДНК или т.п., библиотека дисплея; например, как доступные из Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; Bioinvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif.; Ixsys. См., например, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; PCT/U594/1234; WO 92/18619; WO 96/07754; EP 614989; WO 95/16027; WO 88/06630; WO 90/3809; патент США № 4704692; PCT/US91/02989; WO 89/06283; EP 371998; EP 550400; EP 229046; PCT/US91/07149; или случайно полученные пептиды или белки: патенты США № 5723323; 5763192; 5814476; 5817483; 5824514; 5976862; WO 86/05803, EP 590689, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки или которые зависят от иммунизации трансгенных животных (например, SCID мыши, Nguyen et al., *Microbiol. Immunol.*, 41:901-907 (1997); Sandhu et al., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 16:95-118 (1996); Eren et al., *Immunol.*, 93:154-161 (1998), каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки, а также отсылочные патенты и заявки), которые способны производить набор человеческих антител, как известно из данной области техники и/или как описано в настоящем описании. Такие методы включают, но не ограничиваются ими, рибосомный дисплей (Hanes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:14130-14135 (November 1998)); методы получения антител из единичной клетки (патент США № 5627052, Wen et al., *J. Immunol.*, 17:887-892 (1987); Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:7843-7848 (1996)); микропланшеты с гелем и проточная цитометрия (Powell et al., *Biotechnol.*, 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, Mass.; Gray et al., *J. Imm. Meth.*, 182:155-163 (1995); Kenny et al., *Bio/Technol.*, 13:787-790 (1995)); отбор В-клеток (Steenbakkers et al., *Molec. Biol. Reports*, 19:125-134 (1994); Jonak et al., *Progress Biotech*, vol. 5, *in vitro* Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

Способы инженерии или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител могут также применяться, и известны из уровня техники. Как правило, гуманизованное или сконструированное антитело имеет одну или несколько аминокислотных остатков от источника, который не является человеческим, например, но не ограничиваясь ими, мыши, крысы, кролика, низшего примата или других млекопитающих. Эти человеческие аминокислотные остатки часто называют "импортируемые" остатки, которые как правило берут от "импортируемого" переменного, константного или другого домена известной человеческой последовательности. Известные последовательности человеческого Ig раскрыты, например, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html, каждая включена в настоящее изобретение посредством ссылки в полном объеме. Такие импортируемые последовательности могут применяться для снижения иммуногенности или снижения, усиления или изменения связывания, аффинности, авидности, специфичности, периода полураспада или другой соответствующей характеристики, известной из данной области техники. Как правило, часть или целиком нечеловеческие или человеческие последовательности CDR сохраняются, при этом часть или все каркасные и/или константные участки нечеловеческих последовательностей заменены человеческими или другими аминокислотами. Антитела могут также при желании быть гуманизованы с сохранением высокой аффинности для антигена и других благоприятных биологических свойств, с применением трехмерных моделей иммуноглобулина, которые известны специалистам в данной области техники. Существуют компьютерные программы, которые иллюстрируют и показывают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных вариантов последовательностей иммуноглобулина. Изучение этих отображений позволяет анализировать вероятные роли остатков в функционировании потенциальной последовательности иммуноглобулина, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность потенциального иммуноглобулина связываться с

антигеном. Таким образом, каркасные (FR) остатки могут быть выбраны и объединены из консенсусных или импортируемых последовательностей, чтобы достигались желаемые характеристики антитела, такие как повышенная аффинность к антигену-мишени. В общем, остатки CDR непосредственно и наиболее существенно участвуют в воздействии на связывание антигена. Гуманизация или инженерия антител по настоящему изобретению может быть выполнена с применением любого известного способа, такого как, но не ограничиваясь ими, описанный в, например, Winter (Jones et al., *Nature*, 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534 (1988)); Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993); патентах США № 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, каждая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, включая ссылки, указанные в них.

Анти-VISTA антитело может также быть, при желании, получено путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, кролика, хомяка, низшего примата и тому подобного), способного вырабатывать совокупность человеческих антител, как описано в настоящей заявке и/или известно из данного уровня техники. Клетки, которые вырабатывают человеческое анти-VISTA антитело, могут быть выделены из таких животных и иммортализованы с применением подходящих способов, таких как способы, описанные в настоящем описании.

Трансгенные животные, которые вырабатывают совокупность человеческих антител, которые связываются с человеческими антигенами, могут быть получены известными способами (например, но не ограничиваясь ими, патенты США № 5770428, 5569825, 5545806, 5625126, 5625825, 5633425, 5661016 и 5789650, выданных Lonberg et al., Jakobovits et al., WO 98/50433, Jakobovits et al., WO 98/24893, Lonberg et al., WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al., WO 94/25585, Kucherlapate et al., WO 96/34096, Kucherlapate et al., EP 0463151 B1, Kucherlapate et al., EP 0710719 A1, Surani et al., U.S., pat. № 5545807, Bruggemann et al., WO 90/04036, Bruggemann et al., EP 0438474 B1, Lonberg et al., EP 0814259 A2, Lonberg et al., GB 2272440 A, Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994), Taylor et al., *Int. Immunol.*, 6(4):579-591 (1994), Green et al., *Nature Genetics*, 7:13-21 (1994), Mendez et al., *Nature Genetics*, 15:146-156 (1997), Taylor et al., *Nucleic Acids Research*, 20(23):6287-6295 (1992), Tuaille et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., *Int. Rev. Immunol.*, 13(1):65-93 (1995) и Fishwald et al., *Nat. Biotechnol.*, 14(7):845-851 (1996), каждый из которых включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Как правило, эти мыши включают по меньшей мере один трансген, включающий ДНК от по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который является функционально перестроенным, или который может подвергаться функциональному перестроению. Эндогенные локусы иммуноглобулина в такой мыши может быть нарушены или удалены, чтобы устранить способность животного вырабатывать антитела, кодируемые эндогенными генами.

Скрининг антител на специфическое связывание с подобными белками или фрагментами может быть легко достигнут с применением отображения пептидных библиотек. Данный способ включает скрининг больших коллекций пептидов для отдельных членов, имеющих желаемую функцию или структуру. Скрининг антител отображенных пептидных библиотек дисплеев известны из данного уровня техники. Последовательности отображенных пептидов могут быть от 3 до 5000 или более аминокислот в длину, нередко от 5-100 аминокислот в длину, а часто от приблизительно 8 до 25 аминокислот в длину. В дополнении к прямым химическим синтетическим способам для получения пептидных библиотек, некоторые способы с рекомбинантной ДНК были описаны. Один тип включает отображенную пептидной последовательности на поверхности бактериофага или клетки. Каждый бактериофаг или клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую определенные отображаемые пептидные последовательности. Такие способы описаны в публикациях патентов РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278. Другие системы для получения пептидных библиотек имеют аспекты как химического синтеза *in vitro*, так и рекомбинантных способов. См. публикации патентов РСТ № 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США № 5658754 и 5643768. Отображение пептидных библиотек, вектор, и наборы для скрининга являются коммерчески доступными от таких поставщиков как Invitrogen (Carlsbad, Calif.) и Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, переуступленный Duax, 5427908, 5580717, 5885793, переуступленный Cambridge antibody Technologies; 5750373, переуступленный Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493 и 5698417.

Антитела по настоящему изобретению могут быть также получены с применением по меньшей мере одного анти-VISTA антитела, кодирующего нуклеиновую кислоту для получения трансгенных животных, таких как козы, коровы, бараны и т.п., которые вырабатывают такие антитела в их молоке. Такие животные могут быть получены с применением известных способов. См., например, не ограничиваясь ими, патенты США № 5827690; 5849992; 4873316; 5849992; 5994616; 5565362; 5304489, и подобные, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

Анти-VISTA антитела по настоящему изобретению могут быть получены с применением трансген-

ных растений согласно известным способам. См. также, например, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30:99-108 (October, 1999); Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 240:95-118 (1999); и приведенные в них ссылки; Ma et al., *Trends Biotechnol.*, 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.*, 109:341-6 (1995); Whitlam et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 22:940-944 (1994); и приведенные в них ссылки. Каждая из вышеприведенных ссылок включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Антитела по настоящему изобретению могут связываться с человеческими VISTA с различной аффинностью (K_D). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одно моноклональное антитело по настоящему изобретению может дополнительно связываться с человеческим VISTA с высокой аффинностью. Например, человеческое моноклональное антитело может связываться с человеческим VISTA с K_D равным или менее чем приблизительно 10^{-7} М, таким как, но не ограничиваясь, 0.1-9.9 (или любой диапазон или значение в них) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} или любой диапазон или значение в них. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент антитела может связываться с человеческим VISTA с аффинностью по меньшей мере 1×10^{-7} л/моль, например по меньшей мере 1×10^{-8} л/моль, например по меньшей мере 1×10^{-9} л/моль.

Аффинность или авидность антитела для антигена может быть определена экспериментально с применением любого подходящего способа. (См., например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", In *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); и способы, описанные в настоящем изобретении). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьировать, если измеряли при различных условиях (например, концентрация соли, pH). Таким образом, измерение аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например, K_D , K_a , K_d) предпочтительно осуществляются со стандартными растворами антитела и антигена и стандартизированным буфером.

Молекулы нуклеиновой кислоты.

При использовании информации, приводимой в настоящем описании, такие нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70-100% заменимых аминокислот по меньшей мере одного из указанных фрагментов, вариантов или их консенсусных последовательностей или внесенного вектора, содержащего по меньшей мере одну из этих последовательностей, молекулу нуклеотидной кислоты по настоящему изобретению, кодирующую по меньшей мере одно анти-VISTA антитело, включающее все переменные участки тяжелой цепи CDR SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и/или все переменные участки легкой цепи CDR SEQ ID NO: 4, 5 и 6 могут быть получены с применением способов, описанных в настоящем изобретении или известных из данного уровня техники.

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть в форме РНК, такие как мРНК, гРНК, тРНК или любая другая форма, или в форме ДНК, включая, но не ограничиваясь ими, кДНК и геномная ДНК, полученные путем клонирования или изготовлены синтетически, или любые их комбинации. ДНК может быть трехспиральной, двухспиральной или односпиральной или любой их комбинации. Любая часть по меньшей мере одной нити ДНК или РНК может быть кодирующей цепью, также известной как нетранскрибируемая нить, или она может быть некодирующей цепью, также называемая анти-смысловой цепью.

Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут включать в себя молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие открытую рамку считывания (ORF), например, но не ограничиваясь ими по меньшей мере одну указанную часть по меньшей мере одного CDR, как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи или легкой цепи; молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность для анти-VISTA антитела или фрагмента, например, фрагмент, содержащий переменный участок; и молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают нуклеотидную последовательность отличную от описанных выше, но которая в связи с вырожденностью генетического кода еще кодирует по меньшей мере одно анти-VISTA антитело, как описано в настоящем описании и/или известно из уровня техники. Для специалистов в данной области техники является обычным получение таких вариантов вырожденной нуклеиновой кислоты, которые кодируют специфические анти-VISTA антитела по настоящему изобретению. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение.

Как указано в настоящем описании, молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую анти-VISTA антитело, может включать, но не ограничиваясь ими, кодирующую аминокислотную последовательность фрагмента антитела; кодирующую последовательность целого антитела или его части; кодирующую последовательность антитела, фрагмента или части, а также дополнительные последовательности, такие как последовательности, кодирующие по меньшей мере одного лидерного сигнала или пептида слияния, содержащий или без вышеуказанных дополнительных кодирующих последовательностей, таких как по меньшей мере один интрон, вместе с дополнительными, некодирующими последовательностями, включая, но не ограничиваясь ими, 5' и 3' некодирующие последовательности, такие как транскрибируемые, нетранскрибируемые последовательности, которые играют роль в транскрипции, процессинге мРНК, включая сплайсинг и сигналы полиаденилирования (например-связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительная кодирующая

последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие, которые обеспечивают дополнительные функциональные возможности. Таким образом, последовательность, кодирующая анти-тело, может быть слита с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, который облегчает очистку слитых антител, содержащая фрагмент антитела или часть. Человеческие гены, которые кодируют константные (С) участки антител, фрагментов или участков по настоящему изобретению, могут быть получены из библиотеки эмбриональной печени человека с помощью известных способов. Участки С человеческих генов могут быть получены из любых человеческих клеток, включая те, которые экспрессируют или вырабатывают человеческие иммуноглобулины. Человеческий С_H участок может быть получен из любого известного класса или изоформа человеческих Н цепей, включая γ , μ , α , δ или ϵ и их подтипов, таких как G1, G2, G3 и G4, поскольку Н цепь изоформа отвечает за различные эффекторные функции антитела, выбор С_H участка будет определяться желаемыми эффекторными функциями, такими как фиксация комплемента или активность в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Композиции.

Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем изобретении, получают в соответствии со стандартными методиками и вводятся в дозах, которые выбраны для лечения, например, снижения, предотвращения или устранения, или замедления или остановки прогрессирующего состояния, подвергающегося лечению (См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, и Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки, для общего описания способов введения различных веществ для терапии человека). Композиции, содержащие описанные в настоящем изобретении антитела и вещества могут быть доставлены с применением контролируемых или замедленного высвобождения систем доставки (например, капсулы, биоразлагаемые матрицы). Примеры систем доставки с замедленным высвобождением для доставки лекарственных средств, которые подходят для введения композиций заявленных соединений описаны в, например, патентах США № US 5990092; 5039660; 4452775; и 3854480, полное содержание которых включено в настоящее изобретение посредством ссылки. Для приготовления фармацевтических композиций из анти-VISTA антител и/или фрагментов по настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители могут быть твердыми или жидкими. Препараты в твердой форме включают в себя порошки, таблетки, пилюли, капсулы, облатки, суппозитории и диспергируемые гранулы. Например, соединения по настоящему изобретению могут быть в форме порошка для восстановления в момент доставки. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ, которые могут также влиять как растворители, ароматизаторы, солюбилизаторы, смазывающие вещества, суспендирующие вещества, связующие вещества, консерванты, вещества для улучшения распадаемости таблеток, или инкапсулирующий материал. В порошках носитель представляет собой мелкодисперсное твердое вещество, которое в смеси с мелкодисперсным активным веществом.

Порошки и таблетки предпочтительно содержат от приблизительно одного до приблизительно семидесяти процентов активного вещества. Подходящие носители представляют собой карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, легко-плавящийся воск, масло какао и т.п. Таблетки, порошки, облатки, пастилки, быстро-плавящиеся полоски, капсулы и пилюли могут применяться в качестве твердых лекарственных форм, содержащие активное вещество, подходящее для перорального введения.

Препараты в жидкой лекарственной форме включают растворы, суспензии, удерживающие клизмы и эмульсии, например водные или водно-пропиленгликолевые растворы. Для парентерального введения жидкие препараты могут быть получены в виде раствора в водном пропиленгликолевом растворе.

Фармацевтическая композиция может быть в единичной лекарственной форме. В такой форме композиция подразделяется на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного вещества. Единичная лекарственная форма может быть упакованным препаратом, упаковка содержит дискретные количества единичных доз. Дозировки могут изменяться в зависимости от потребностей пациента, тяжести состояния, подвергающегося лечению, соединения и применяющегося пути введения. Определение правильной дозы для конкретной ситуации известно специалисту в данной области техники.

Также фармацевтическая композиция может содержать при желании другие совместимые вещества, например, фармацевтические, терапевтические или профилактические вещества. Терапевтические или профилактические вещества включают в себя, но не ограничиваются ими, пептиды, полипептиды, белки, белки слияния, молекулы нуклеиновых кислот, малые молекулы, вещества миметики, синтетические лекарственные средства, молекулы неорганического соединения и молекулы органического соединения. Примеры классов таких веществ (например, противоопухолевые вещества) включают, но не ограничиваются ими, цитотоксины, ингибиторы ангиогенеза, иммуномодулирующие вещества, иммуноонкологические вещества и вещества, применяемые при помощи от боли или для возмещения вредного воздействия одного или нескольких терапевтических веществ (например, бисфосфонат применяют для снижения эффектов гиперкальциемии глюкокортикоидов). Ингибиторы ангиогенеза, вещества и терапии, которые пригодны для применения в композициях и способах, описанных в настоящем описании, включают, но

не ограничиваются ими, ангиостатин (фрагмент плазминогена); антиангиогенный антитромбин III; ангиозим. Бисфосфонат включает, но не ограничивается ими, алендронат, клодронат, этидронат, ибандронат, памидронат, ризедронат, тилудронат и золедронат.

Иммуномодулирующие вещества и терапии, которые пригодны для применения в композициях и способах, описанных в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, анти-T-клеточного рецептора антитела, такие как анти-CD3 антитела (например Нувион (Protein Design Labs), ОКТ3 (Johnson & Johnson), или анти-CD20 антитела Ритуксан (IDEC)), анти-CD52 антитела (например Кампат 1Н (Пех)), анти-CD11а антитела (например Ксанелим (Genentech)); анти-цитокин или анти-цитокин рецептора антитела и антагонисты, такие как анти-IL-2 рецептора антитела (Зенапакс (Protein Design Labs)), анти-IL-6 рецептора антитела (например MRA (Chugai)), и анти-IL-12 антитела (CNTO1275 (Janssen)), анти-TNF α антитела (Ремикейд (Janssen)) или антагонист TNF рецептора (Энбрел (Immunex)), анти-IL-6 антитела (BE8 (Diaclope) и силтуксимаб (CNTO32 (Centocog)), и антитела, которые иммуноспецифически связываются с опухолеассоциированными антигенами (например, трастузумаб (Genentech)).

Иммуноонкологические вещества, которые пригодны для применения в композициях и способах, описанных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, ипилимумаб (анти-CTLA-4), ниволумаб (анти-PD-1), пембролизумаб (анти-PD-1), анти-PD-L1 антитела и анти-LAG-3 антитела. Композиция предпочтительно выполнена в форме единицы дозирования, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или фрагмента. Примерами единиц дозирования являются таблетки и капсулы. Для терапевтических целей таблетки и капсулы могут содержать в дополнение к активному веществу обычные носители, такие как связующие вещества, например аравийская камедь, желатин, поливинилпирролидон, сорбит или трагакант; наполнители, например, фосфат кальция, глицин, лактоза, кукурузный крахмал, сорбит или сахароза; смазывающие вещества, например, стеарат магния, полиэтиленгликоль, двуокись кремния или тальк; разрыхлители, например, картофельный крахмал, ароматизатор или красящие вещества, или приемлемые смачивающие вещества. Жидкие препараты для перорального введения как правило в форме водных или масляных растворов, суспензий, эмульсий, сиропов или эликсиров могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие вещества, эмульгирующие вещества, безводные вещества, консерванты, красящие вещества и ароматизирующие вещества. Примеры добавок для жидких препаратов включают в себя аравийскую камедь, миндальное масло, этиловый спирт, фракционированное кокосовое масло, желатин, сироп глюкозы, глицерин, гидрогенизированные пищевые жиры, лецитин, метилцеллюлозу, метил или пропил парагидроксibenзоат, пропиленгликоль, сорбит или сорбиновая кислота.

Другие общие подробности относительно способов получения и применения соединений и композиций, описанных в настоящем изобретении, хорошо известны из уровня техники. См., например, патент США № 7820169, содержание которого включено в полном объеме.

Способы лечения.

Любой специалист в данной области техники, например клиницист, может определить подходящую дозу и путь введения для конкретного антитела, фрагмента или композиции для введения индивидууму, учитывая выбранные вещества, лекарственную форму и путь введения, различные особенности пациента и другие факторы. Предпочтительно, доза не вызывает или приносит минимальные или не вредные побочные действия. При стандартных многократных режимах приема препарата, фармацевтическое вещество может быть введено по схеме применения, которое предназначено для поддержания заранее определенной или оптимальной концентрации плазмы у субъекта, подвергающегося лечению. Антитела, фрагменты и композиции могут быть добавлены в любом подходящем диапазоне доз или терапевтически эффективном количестве, например, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0, 15.0, 16.0, 17.0, 18.0, 19.0, 20.0, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мг/кг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, доза вводимой композиции, антитела или фрагмента составляет 0.1-15 мг/кг на каждое введение.

Антитело или фрагмент может быть введен один раз, по меньшей мере один раз, два раза, по меньшей мере два раза, три раза или по меньшей мере три раза в день. Антитело или фрагмент может быть введен один раз, по меньшей мере один раз, два раза, по меньшей мере два раза, три раза, по меньшей мере три раза, четыре раза, по меньшей мере четыре раза, пять раз, по меньшей мере пять раз, шесть раз в неделю или по меньшей мере шесть раз в неделю. Антитело или фрагмент может быть введено один раз в месяц, по меньшей мере один раз в месяц, два раза в месяц, по меньшей мере два раза в месяц, три раза в месяц или по меньшей мере три раза в месяц. Антитело или фрагмент антитела может быть введен один раз в год, по меньшей мере один раз в год, два раза в год, по меньшей мере два раза в год, три раза в год, по меньшей мере три раза в год, четыре раза в год, по меньшей мере четыре раза в год, пять раз в год, по меньшей мере пять раз в год, шесть раз в год или по меньшей мере шесть раз в год. Анти-VISTA антитела, фрагменты или композиции могут, например, быть введены через парентеральный или непарентеральный способы, включая, но не ограничиваясь ими, внутривенно, подкожно, перорально, ректально, внутримышечно, внутривнутрино, чрезслизистую, внутрикожно, субарахноидально, назально или наружно. Среднему специалисту в данной области техники будет очевидно, что следующие лекарственные формы могут содержать в качестве активного вещества либо соединения или соответствующую

фармацевтически приемлемую соль соединения по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственные формы могут содержать в качестве активного вещества либо соединение или соответствующую фармацевтически приемлемую соль соединения. Анти-VISTA антитела по настоящему изобретению могут быть введены как часть комбинированной терапии (например, друг с другом или одним или несколькими других терапевтических веществ). Соединения по настоящему изобретению могут быть введены до, после или одновременно с одним или несколькими других терапевтических веществ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению или другое фармацевтическое вещество может быть совместно введено одновременно (например, параллельно) либо в виде отдельных препаратов или в виде совместных препаратов. В другом варианте, вещества могут быть введены последовательно, в виде отдельных композиций, в соответствующие периоды времени, как определено квалифицированным клиницистом (например, время, достаточное для обеспечения совпадения фармацевтических эффектов терапий). Соединение по настоящему изобретению и одно или несколько терапевтических веществ могут быть введены в однократной дозе или в многократных дозах, в последовательности и по режиму, подходящих для достижения желаемого терапевтического эффекта. Настоящее изобретение также относится к способу модуляции или лечения по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани, органа, животного или пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения и композиции по настоящему изобретению применяются для лечения или предотвращения рака. Рак может включать в себя любую злокачественную или доброкачественную опухоль любого органа или системы организма. Примеры включают в себя, но не ограничиваются ими, следующие: рак молочной железы, рак пищеварительного тракта/желудочно-кишечного тракта, эндокринный рак, нейроэндокринный рак, рак глаза, рак мочеполовой системы, рак половых клеток, гинекологический рак, рак головы и шеи, рак гематологический/крови, скелетно-мышечный рак, неврологический рак, рак дыхательных путей/грудного отдела, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак легких, рак тела матки, рак почки, рак поджелудочной железы, рак печени, рак желудка, рак яичка, рак пищевода, рак предстательной железы, рак мозга, рак шейки матки, рак яичников и рак щитовидной железы. Другие виды рака могут включать в себя лейкоз, меланому и лимфому, а также любой вид рака, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения плотная опухоль инфильтрирована с миелоидными и/или Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой лейкоз, лимфому, миелодиспластический синдром и/или миелому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак может быть лейкозом любого вида или типа, включая в себя лимфоцитарный лейкоз или миелогенный лейкоз, такой как, например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелоидный (миелогенный) лейкоз (AML), хронический гранулоцитарный лейкоз (CMML), лейкоз ворсистых клеток, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лейкоз из больших зернистых лимфоцитов или Т-клеточный лейкоз взрослых. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лимфома представляет собой гистiocитарную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому Ходжкина, а в других вариантах осуществления настоящего изобретения, рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой плотную опухоль, например, меланому или рак мочевого пузыря. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рак легких, такой как немелкоклеточная карцинома легких (NSCLC).

Настоящее изобретение также относится к способу модуляции или лечения по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани, органе, животном или пациенте, включая, но не ограничиваясь ими, по меньшей мере одно из следующего: лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), В-клеточный, Т-клеточный или FAB ALL, острый миелобластный лейкоз (AML), хронический миелоцитарный лейкоз (CMML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лейкоз ворсистых клеток, миелодиспластический синдром (MDS), лимфома, ходжкинская лимфома, злокачественная лимфома, неходжкинская лимфома, лимфосаркома Беркитта, множественная миелома, саркома Капоши, карцинома толстой и прямой кишки, карцинома поджелудочной железы, носоглоточная карцинома, злокачественный гистиоцитоз, паранеопластический синдром/злокачественная гиперкальциемия, плотные опухоли, аденокарциномы, саркомы, злокачественная меланома, гемангиома, метастазирующая опухоль, рак, связанный с резорбцией кости, рак, связанный с болью в костях и т.п. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения плотная опухоль инфильтрирована с миелоидными и/или Т-клетками. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, плотная опухоль представляет собой рак легких, такой как немелкоклеточная карцинома легких (NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения и терапии, описанные в настоящем описании, совместно вводят с вакциной (такой как вакцина на основе вирусного вектора, бактериальная вакцина, вакцина на основе клеток, ДНК вакцина, РНК вакцина, пептидная вакцина или белковая вакцина). Такие вакцины хорошо известны в данной области техники. См., например, Jeffrey Schlom, "Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and Moving Forward", J. Natl. Cancer Inst.; 104:599-613 (2012), содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения и терапии, описанные в настоящем описании, совместно вводят с веществами для химиотерапии, гормонотерапии и биологических терапий, и/или бисфосфонатами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вещества для химиотерапии включают одно или несколько из следующих: арбоплатин (Параплатин), цисплатин (Платинол, Платинол-AQ), циклофосфамид (Цитоксан, Неосар), доксорубицин (Адриамицин), этопозид (Вепезид), флуороурацил (5-FU), гемцитабин (Гемзар), иринотекан (Камптосар), паклитаксел (Таксол), топотекан (Гикамтин), винкристин (Онковин, Винкасар PFS), винбластин (Велбан).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения анти-VISTA соединения и терапии, описанные в настоящем описании, совместно вводят с одним или несколькими антителами иммунных контрольных точек, таких как, например, ниволумаб, пембролизумаб, тремелиумаб, ипилиумаб, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-L2 антитело, анти-TIM-3 антитело, анти-LAG-3v, анти-OX40 антитело и анти-GTR антитело.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения анти-VISTA соединения и терапии, описанные в настоящем описании, совместно вводят с низкомолекулярным ингибитором индоламин 2,3-диоксигеназой (IDO). Анти-VISTA соединения и композиции по настоящему изобретению могут быть введены субъекту, нуждающемуся в этом, для предотвращения (включая предотвращение рецидива рака) или лечения (например, сдерживать развитие или улучшение рака или одного или нескольких его симптомов) рака. Любое вещество или терапия (например, химиотерапия, лучевая терапия, целевые терапии, такие как иматиниб, сорафениб и вемурафениб, гормонотерапия и/или биологическая терапия или иммунотерапия), которые заведомо полезные или которые применялись или применяются в настоящее время для предотвращения, лечения, сдерживание развития или улучшение рака или одного или нескольких его симптомов могут применяться в сочетании с соединением или композицией по изобретению, описанных в настоящему описанию. Противораковые вещества, но не ограничиваясь ими, следующие: 5-фторурацил; активин; альдеслейкин; алтретамин; аминоклутетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; азациитидин; азетепид; азотимицин; батимастат; бикалутаамид; блеомицина сульфат; бреквинарат натрия; бропиридин; бусульфид; карбоплатин; кармустин; карубицина гидрохлорид; карзелесин; цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; мезилат криснатола; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; дауномицина гидрохлорид; децитабин; дексормаплатин; дезагуанин; мезилат дезагуанина; диазквон; доцетаксел; доксорубицин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; цитрат дролоксифена; пропионат дромостанолон; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитина гидрохлорид; энлоплатин; энпромаг; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзорубицина гидрохлорид; эстрамустин; фосфат экстрамустина натрия; этанидазол; этопозид; фосфат этопозид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; фосфат флударабина; флуороурацил; флуороцитабин; фосквидон; фостриецин натрия; гемцитабин; гидрохлорид гемцитабина; гидроксимочевина; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; ильмофосин; интерлейкин II (включая рекомбинантный интерлейкин II, или IL2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1b; ипроплатин; иринотекана гидрохлорид; ацетатланреотида; летрозол; лейпролида ацетат; ларозола гидрохлорид; лометрексола натрия соль; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; масопрокол; меклоретамин гидрохлорид; мегестрол ацетат; меленгестролацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредепид; митомицин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофеноловая кислота; нокодазол; ормаплатин; паклитаксел; пэгаспаргаза; порфромидин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пуромидин; роглетимид; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфосат натрия; спарзомицин; спирумустин; спиролатин; стрептоницин; стрептозоцин; сулофенур; тализомицин; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиазофуридин; тирапазамин; топотекан; триметрексат; триметрексата глюкуролат; трипторелин; урамустин; уредепид; вапреотид; вертепорфин; винбластин сульфат; винкристина сульфат; виндесин; виндесина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлеуросина сульфат; винорелбина тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностагин; зорубицина гидрохлорид. Целевые терапии включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы тирозинкиназы (например, иматиниб, сорафениб и вемурафениб). Настоящее изобретение также включает введение анти-VISTA соединения по изобретению в сочетании с лучевой терапией, включающей применение рентгеновское излучение, гамма-излучение и другие источники излучения для разрушения раковых клеток. Лечение рака известно в данной области техники и описаны в такой литературе, как Physician's Desk Reference (57th ed., 2003). Анти-VISTA антитела, описанные в настоящем изобретении, также полезны, например, при лечении хронических инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ, ВВВ, ВГС, и ВПП, в числе прочих.

Различные свойства и информация о последовательности для выбранных анти-VISTA антител по настоящему изобретению представлены в табл. 1A, 1B и 2 настоящего описания.

Последовательности CDR выбранных полностью
человеческих или гуманизированных анти-человеческих VISTA антител

mAb ID	VH семейство	Тяжелая цепь cdr1 (lmgт)	Тяжелая цепь cdr2 (lmgт)	Тяжелая цепь cdr3 (lmgт)	Легкая цепь cdr1 (lmgт)	Легкая цепь cdr2 (lmgт)	Легкая цепь cdr3 (lmgт)
VSTB50	B	GYFTFTNYG (SEQ ID NO:1)	INPYTGEP (SEQ ID NO:2)	AREGYGNYIFPY (SEQ ID NO:3)	ESVDTYANSL (SEQ ID NO:4)	RAS (SEQ ID NO:5)	QQTNEDPRT (SEQ ID NO:6)
VSTB53		GYFTFHYT (SEQ ID NO:7)	IIPSSGYS (SEQ ID NO:8)	ARGAYDDYDYAMDY (SEQ ID NO:9)	QTIVHSNGNTY (SEQ ID NO:10)	KVS (SEQ ID NO:11)	FQASHVPWT(SEQ ID NO:12)
VSTB60	B	GYFTFTNYG (SEQ ID NO:13)	INTYTGES (SEQ ID NO:14)	ARDYYGIYVSAY (SEQ ID NO:15)	ESVDNYANSF (SEQ ID NO:16)	RAS (SEQ ID NO:17)	QQSHEDPYT (SEQ ID NO:18)
VSTB95		GFTFRNYG (SEQ ID NO:19)	IISGGSYT (SEQ ID NO:20)	ARIYDHDGDYAMDY (SEQ ID NO:21)	QSIHVSNGNTY (SEQ ID NO:22)	KVS (SEQ ID NO:23)	FQGSHPWT (SEQ ID NO:24)
VSTB112	D	GGTFSSYA (SEQ ID NO:25)	IIPFGTA (SEQ ID NO:26)	ARSSYGWSEYFDY (SEQ ID NO:27)	QSIDTR (SEQ ID NO:28)	SAS (SEQ ID NO:29)	QQSAYNPIT (SEQ ID NO:30)
VSTB116	D	GGTFSSYA (SEQ ID NO:31)	IIPFGTA(SEQ ID NO:32)	ARSSYGWSEYFDY (SEQ ID NO:33)	QSINTN (SEQ ID NO:34)	AAS (SEQ ID NO:35)	QQARDTPIT(SEQ ID NO:36)

Таблица 1В

Последовательности тяжелой и легкой цепей выбранных полностью
человеческих или гуманизированных анти-человеческих VISTA антител

ID Белка	Тяжелая-цепь AA CDS	Легкая-цепь AA CDS
VSTB50	QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTNYGLNWRQAPGQGLEW MGWINPYTGEPTYADDFKGRFVSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYCA REGYGNFYFPYWGQGLTQVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO:47)	DIVMTQTPLSLVTPGQPASISCRASESDVT YANSLMHWYLQKPGQSPQLLIYRASNL GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCCQTNEDPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNINFPYFREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:48)
VSTB53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYTHIHWVRQAPGQGLEW MGYIIPSSGYSEYNQKFKDRVTMTRDTSSTVYMESSLRSEDTAVYCA RGAYDDYDYAMDYWGQGLTQVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:49)	DIVMTQSPSLPVTPGEPASISCRSSQTIH SNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCFQASHVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNINFPYFREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:50)
VSTB60	QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTNYGMTWVRQAPGQGLEW MGWINTYTGESTYADDFKGRFVSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYCA RDYYGIYVSAYWGQGLTQVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO:51)	DIVMTQTPLSLVTPGQPASISCRASESVD NYANSFMHWYLQKPGQSPQLLIYRASNL SGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCCQSHEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNINFPYFREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK KSFNRGEC (SEQ ID NO:52)

<p>VSTB95</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYGMSWVRQAPGKGLEW VASIISGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR IYDHDGDDYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO:53)</p>	<p>DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSIH SNGNTYLEWYLYKPKGQSPQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVY YCFQGSHPVPTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:54)</p>
<p>VSTB112</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO:55)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDT RLNWIYQQKPKGKAPKLLIYASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQA YNPITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:56)</p>
<p>VSTB116</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO:57)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIINT NLNWIYQQKPKGKAPKLLIYASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQA DTPITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:58)</p>
<p>VSTB140*</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL <u>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGT</u> <u>QTYTCNVNPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCPAPAAAASSVFLFPPKPKD</u> <u>TLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN</u> <u>STFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP</u> <u>MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>PGK</u> (SEQ ID NO:59)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDT RLNWIYQQKPKGKAPKLLIYASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQA YNPITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE <u>QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN</u> <u>ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK</u> <u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE</u> C (SEQ ID NO:56)</p>

VSTB149* ^Δ	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFGQGRVITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGLTIVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL <u>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT</u> <u>QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPDVFLFPP</u> <u>KPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGK</u> (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSIDT RLNWIYQQKPKGAPKLLIYSASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSA YNPITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE <u>QLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDN</u> <u>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK</u> <u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE</u> C (SEQ ID NO:56)
VSTB174*	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFGQGRVITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SSYGWSYEFDYWGQGLTIVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL <u>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT</u> <u>QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPAPELLGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u> <u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>LSPGK</u> (SEQ ID NO:61)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSIDT RLNWIYQQKPKGAPKLLIYSASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSA YNPITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE <u>QLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDN</u> <u>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK</u> <u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE</u> C (SEQ ID NO:56)
	<u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u> <u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>LSPGK</u> (SEQ ID NO:61)	<u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE</u> C (SEQ ID NO:56)

* Последовательности константного участка в VSTB140, VSTB149 и VSTB174 подчеркнуты.

^Δ Аминокислотные остатки, придающие устойчивость к протеазе в тяжелой цепи VSTB149, выделены жирным шрифтом.

Таблица 2

Константа диссоциации (K_D) для выбранных анти-VISTA антител

Образец	KD (M)	ka1 (1/Mc)	kd1 (1/c)			
S1	1.71E-10	1.69E+06	2.89E-04	1.09E-10	1.11E+06	1.21E-04
S40	5.07E-10	1.46E+05	7.40E-05	6.96E-10	1.39E+05	9.69E-05
S41	6.32E-10	4.82E+05	3.05E-04	3.10E-10	7.08E+05	2.19E-04
S42	1.04E-10	1.05E+06	1.09E-04	2.65E-10	5.13E+05	1.36E-04
S43	2.64E-11	1.25E+06	3.30E-05	5.28E-11	1.18E+06	6.22E-05
S44	2.53E-11	1.23E+06	3.12E-05	6.40E-11	9.93E+05	6.36E-05
S45	2.35E-11	1.58E+06	3.72E-05	2.58E-11	1.46E+06	3.77E-05
S46	1.06E-10	1.56E+06	1.66E-04	2.96E-10	1.50E+06	4.44E-04
S47	3.56E-10	5.14E+05	1.83E-04	2.52E-10	5.69E+05	1.43E-04
S33	8.30E-10	1.23E+06	1.02E-03	1.22E-09	8.96E+05	1.10E-03
S34	1.08E-09	5.95E+05	6.43E-04	2.80E-09	5.20E+05	1.46E-03
S35	8.06E-11	2.08E+06	1.68E-04	1.35E-10	1.78E+06	2.41E-04
S36	6.29E-11	1.77E+06	1.12E-04	2.90E-11	1.58E+06	4.58E-05
S37	2.23E-09	5.10E+05	1.14E-03	4.43E-09	3.94E+05	1.75E-03
S38	2.26E-09	5.18E+05	1.17E-03	2.03E-09	5.37E+05	1.09E-03
S39	5.62E-10	3.97E+05	2.23E-04	3.47E-10	4.15E+05	1.44E-04
S25	1.31E-09	6.21E+05	8.12E-04	1.10E-09	5.65E+05	6.24E-04

S26	Нет связывания			3.53E-09	2.38E+05	8.41E-04
S27	1.13E-09	8.86E+05	9.97E-04	1.61E-09	7.12E+05	1.15E-03
S48	3.12E-10	1.24E+06	3.87E-04	1.21E-09	8.78E+05	1.06E-03
S28	2.03E-09	1.08E+06	2.19E-03	2.03E-09	9.30E+05	1.88E-03
S29	3.78E-11	1.42E+06	5.38E-05	8.90E-11	9.06E+05	8.06E-05
S30	Нет связывания			Нет связывания		
S31	Слабая связь			Слабая связь		
S32	Слабая связь			Слабая связь		
S15	9.34E-11	6.46E+05	6.04E-05	5.13E-10	3.50E+05	1.80E-04
S16	1.26E-10	5.54E+05	6.99E-05	1.92E-10	4.43E+05	8.53E-05
S17	7.68E-10	9.88E+05	7.59E-04	4.10E-10	7.09E+05	2.91E-04
S18	2.28E-09	4.90E+05	1.12E-03	1.05E-09	3.13E+05	3.29E-04
S19	1.54E-09	1.02E+06	1.58E-03	2.86E-10	7.03E+05	2.01E-04
S20	1.48E-09	6.67E+05	9.85E-04	4.57E-10	6.36E+05	2.91E-04
S21	3.18E-09	3.16E+05	1.00E-03	1.34E-09	2.70E+05	3.60E-04
S22	2.98E-09	1.09E+06	3.25E-03	1.27E-09	1.25E+06	1.59E-03
S6	6.36E-10	5.28E+05	3.36E-04	3.02E-10	5.98E+05	1.80E-04
S7	6.75E-10	1.31E+06	8.87E-04	3.27E-10	1.15E+06	3.75E-04
S8	1.15E-10	1.89E+06	2.18E-04	5.97E-11	1.25E+06	7.48E-05
S9	1.67E-10	1.87E+06	3.11E-04	9.31E-11	1.27E+06	1.18E-04
S10	8.90E-11	1.55E+06	1.38E-04	4.30E-11	1.22E+06	5.27E-05
S12	4.94E-10	1.57E+06	7.76E-04	2.39E-10	1.19E+06	2.86E-04
S13	1.02E-10	1.42E+06	1.44E-04	6.46E-11	9.55E+05	6.17E-05
S14	2.02E-10	1.26E+06	2.55E-04	7.55E-11	1.12E+06	8.43E-05
S1	2.06E-10	1.60E+06	3.29E-04	8.35E-11	1.21E+06	1.01E-04
S2	1.56E-10	9.74E+05	1.52E-04	8.66E-11	7.25E+05	6.28E-05
S3	4.33E-11	9.07E+05	3.93E-05	4.89E-11	7.41E+05	3.63E-05
S4	1.52E-10	8.98E+05	1.36E-04	7.54E-11	6.93E+05	5.23E-05
S49	1.45E-10	1.01E+06	1.46E-04	1.04E-10	7.28E+05	7.60E-05
S5	2.13E-10	1.25E+06	2.67E-04	1.37E-10	8.51E+05	1.17E-04

Примеры

Пример 1. Анализ экспрессии VISTA на человеческих гемопоэтических клетках.

Способы.

Подготовка и окрашивание свежих человеческих PBMCs для экспрессии VISTA.

Экспрессия VISTA была изучена на свежевыделенных человеческих PBMCs (моноклеарах периферической крови) от различных доноров. Анти-человеческие VISTA-биотин (GA-1) применяли для окрашивания (5 мкг/мл). Мышиные IgG1, К-биотин (Клон MOPC-21 при 5 мкг/мл) применяли в качестве контроля изотипа.

Донорский материал.

Образцы крови были получены от Biological Specialty Corp. (Colmar, PA) и были собраны и проанализированы в тот же день. 10 мл цельной крови, содержащей гепарина сульфат, были доставлены для анализа.

Приготовление образца.

Кровь разводили 1:1 в стерильном PBS. 22 мл разбавленной пуповинной крови наслаивали на 20 мл стерильные Ficoll-Huраque (GE Healthcare, cat #17-144003) в 50 мл конических пробирках. Пробирки центрифугировали при 1800 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Моноклеары на границе раздела после центрифугирования собирали с применением 1 мл пипет-дозатора и объединяли в две 50 мл конические пробирки. Стерильный PBS добавляли в каждую пробирку до достижения объема 50 мл и клетки центрифугировали при 300g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант сбрасывали. Клетки ресуспендировали в 50 мл стерильного PBS и пробирки центрифугировали при 300g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант сбрасывали. Клетки объединяли и ресуспендировали в 50 мл стерильного PBS до подсчета.

Протокол окрашивания.

Замороженную пробирку, содержащую 5×10^7 PBMCs, применяли для уравнивания контролей и в качестве контроля для окрашивания. Были использованы следующие реагенты и/или расходные материалы: FACS буфер для окрашивания (BSA) от BD Biosciences (cat #554657) был дополнен 0.2% EDTA; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) (Gibco cat #14190); 96-луночный полипропиленовый кругло-

донный планшет (BD #3077); 1.2 мл полипропиленовые кассетные пробирки (Corning #4451); биотинилированный анти-VISTA клон GA-1 от ImmunoNext Lot #080612B (применяли в 5 мкг/мл); биотинилированные mIg1, контроль К изотипа (Клон MOPC-21); Biolegend, cat #400104 Lot #B116649 (применяли в 5 мкг/мл); анти-человеческие антитела (см. таблицу окрашивания ниже); краситель живых/мертвых в ближней инфракрасной области (Invitrogen, cat #L10119); и реагенты стрептавидина, включая STP-APC (BD Biosciences cat #554067, Lot #04251) (применяли в 1:200 разведении в FACS буфере), STP-PE (Biolegend cat #405203, Lot #B139688) (применяли при 1:200 разведении в FACS буфере), STP-PE Cy7 (показал неспецифическое связывание в образцах контроля изотипа), STP-Q605 (Invitrogen cat #Q10101MP, Lot #53449A) (применяли при 1:200 разведении в FACS буфере).

Протокол окрашивания клеточной поверхности.

Перед окрашиванием 1×10^6 клеток переносили в 96-луночные круглодонные планшеты и промывали с 150 мкл PBS. Планшеты затем центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 3 мин.

Далее клетки промывали вновь в PBS и центрифугировали, как описано выше. Окрашивание живых/мертвых затем осуществляли в 50 мкл PBS, содержащего 0.25 мкл красителя живых/мертвых в ближней инфракрасной области. Через 10 мин при комнатной температуре лунки промывали с 150 мкл буфера для окрашивания FACS и центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 3 мин. Супернатант сбрасывали.

Клетки блокировали с человеческой сывороткой при 1:100 в 50 мкл буфера для окрашивания FACS. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 15 мин. Лунки затем промывали с 150 мкл буфера для окрашивания FACS и центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 3 мин. Супернатант сбрасывали.

Смесь, содержащую следующие антитела, затем добавляли в каждую лунку для окрашивания поверхности. Смеси описаны в табл. 3-6 ниже. Каждая смесь применялась отдельно от других в зависимости от изучаемой популяции.

Таблица 3

Окрашивание клеточной линии

Флюорохро- м	Антиген	Мишень			Изотип	Клон	Поставщи- к	Cat No.	Lot No.	Титр (мкл/10 ⁶ клеток)
		Мышь	Кры- са	Челове- к						
FITC/AF488	CD19			X	mIgG1	H1B19	Biolegend	302206	B123019	2
PE	CD11b			X	mIgG1, K	ICRF44	BD Bio.	555388	45134	2
PerCP-Cy5.5	HLA-DR			X	mIgG2a, K	G46-6	BD Bio.	560652	25161	0.5
PE Cy7	CD16			X	mIgG1, K	3G8	BD Bio.	557744	87825	0.2
APC Cy7	NIR Live/Dead			X						
AF700	CD56			X	mIgG1, K	B159	BD Bio.	557919	19470	1
APC/AF647	VISTA-Bio			X						
PB/V450	CD3			X	mIgG1, K	UCHT1	BD Bio.	558117	90926	0.5
Q605	CD14			X	mIgG2a, K	TuK4	Invitrogen	Q10013	1049158	0.2

Таблица 4

Окрашивание Т-клеток

Флюорохро- м	Антиген	Мишень			Изотип	Клон	Поставщик	Cat No.	Lot No.	Титр (мкл/10 ⁶ Клеток)
		Мышь	Крыса	Человек						
FITC/AF488	CD4			X	mIgG1, K	RPA-T4	BD Bio.	555346	38460	2
PE	VISTA-Bio			X						
PerCP-Cy5.5	CD8			X	mIgG1, K	RPA-T8	BD Bio.	560662	1037	0.5
PE Cy7	CD56			X	mIgG1, K	B159	BD Bio.	557747	47968	0.5
APC Cy7	NIR			X						
AF700	CD45RO			X	mIgG2a, K	UCHL1	Biolegend	304218	B143062	1
APC/AF647	TCRgd			X	mIgG, K	B1	Biolegend	331212	B126473	2
PB/V450	CD45RA			X	mIgG2b, K	HI100	BD Bio.	560363	90928	0.5
Q655	CD3			X	mIgG2a	S4.1	Invitrogen	Q10012	982352	0.5

ДС окрашивание

Флюорохро- мом	Антиген	Мишень			Изотип	Клон	Поставщи- к	Cat No.	Lot No.	Титр (мкл/10 ⁶ клеток)
		Мышь	Кры- са	Челове- к						
FITC/AF488	Lin1			X	Mix	Mix	BD Bio.	340546	2152758	5
PE	CD11c			X	mIgG1, K		BD Bio.	555392	45123	2
PerCP- Cy5.5	HLA-DR			X	mIgG2a , K	G46-6	BD Bio.	560652	25161	0.5
APC Cy7	NIR			X						
APC/AF647	CD83			X	mIgG1, K	HB15 e	BD Bio.	551073	57688	2
BV421	CD123			X	mIgG1, K	6H6	Biolegend	306017	B148193	0.5
Q605	VISTA-Bio			X						

Таблица 6

Миелоидное окрашивание

Флюорохро- мом	Антиген	Мишень			Изотип	Клон	Поставщик	Cat No.	Lot No.	Титр (мкл/10 ⁶ клеток)
		Мышь	Кры- са	Челове- к						
FITC/AF488	CD33			X	mIgG1	HM3- 4	Biolegend	303304	B100963	3
PE	CD11b			X	mIgG1, K	ICRF4 4	BD Bio.	555388	45134	2
APC Cy7	NIR			X						
APC/AF647	VISTA-Bio			X						
Q605	CD45			X	mIgG1, K	HI30	Invitrogen	Q1005 1	880470	1

После окрашивания поверхности, клетки промывали дважды, как описано выше, с буфером для окрашивания FACS и центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 5 мин. Образцы ресуспендировали в 50 мкл буфера для окрашивания FACS, содержащего соответствующий флюоресцентно-меченный стрептавидин. Образцы инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Клетки промывали с 150 мкл буфера для окрашивания FACS и центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 5 мин. Эту стадию промывки повторяли, до того образцы ресуспендировали в 250 мкл буфера для окрашивания FACS. Образцы анализировали на BD LSRFortessa™ клеточном анализаторе (BD Biosciences) в тот же день. Данные анализа

Данные проточной цитометрии повторно анализировали с применением программного обеспечения FlowJo Version 9 для получения конкретных фенотипических популяций. Подсчет среднего геометрического применяли для сравнения экспрессии VISTA в различных клеточных субпопуляциях. Каждая популяция была нормализована для фона с помощью вычитания значений контроля изотипа из значений образцов, обрабатываемых анти-VISTA. Графики получали в Prism и статистические данные получали с применением любого значения Стьюдента, если сравнивались только два образца, или однофакторного дисперсионного анализа с повторной проверкой Бонферрони.

Результаты.

Экспрессия VISTA на человеческих миелоидных и лимфоидных субпопуляциях.

Как показано на фиг. 2A-2E, 3A-3G, 4, 5A, 5B и 6A-6C, экспрессия VISTA на CD14⁺ моноцитах значительно отличалась от всех других популяций (p<0.001).

Никаких существенных различий между другими популяциями не было. Моноциты экспрессировали самые высокие уровни VISTA в периферической крови, с CD14⁺CD16⁻ субпопуляцией, имеющим значительно высокий уровень экспрессии, чем CD14^{lo}CD16⁺ клетки. Тогда как APCs показали умеренную экспрессию VISTA, лимфоидные субпопуляции показали низкие уровни экспрессии.

Экспрессия VISTA на T и NK субпопуляциях человека.

Как показано на фиг. 7A-7E, 8A-8G и 9, с NK субпопуляциями, CD56^{lo} клетки показывали существенно более высокие уровни экспрессии VISTA, чем CD56^{hi} NK-клетки. Субпопуляции T-клеток, CD8⁺ клетки памяти экспрессировали более высокие уровни экспрессии, хотя они не являются значительно выше, чем у CD8⁺ или CD4⁺ интактных T-клеток.

Экспрессия VISTA на субпопуляциях человеческих дендритных клеток.

Как показано на фиг. 10A-10D, 11A-11C и 12, нет существенных различий в экспрессии VISTA; DCs и базофилы показали низкий уровень экспрессии VISTA, у плазматоидных дендритных клеток

(pDCs) как правило, выше, но не в значительной степени.

Вывод.

Данные результаты показывали экспрессию VISTA на различных субпопуляциях иммунных клеток, и что VISTA экспрессируется на моноцитах в более высоких уровнях, с некоторой экспрессией на различных субпопуляциях Т-клеток и NK-клеток, и практически отсутствует экспрессия на В клетках.

Пример 2. Экспрессия VISTA на клетках периферической крови.

Способы.

Окрашивание цельной крови. Свежевыделенную цельную кровь (100 мкл) окрашивали смесью антител, как указано ниже, при инкубации в течение 30 мин при 4°C. Эритроциты (RBCs) лизировали с лизирующим буфером RBC, а оставшиеся клетки промывали 1× буфером для окрашивания. Клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания. Данные собирали с применением проточного цитометра MACSQuant и анализировали с применением программы анализа FlowJo.

Окрашивание мононуклеаров периферической крови (PBMCs). Мононуклеары периферической крови выделяли из цельной крови с применением градиента Фиколла.

Свежевыделенные 1×10^6 PBMCs окрашивали смесью антител в 100 мкл буфера для окрашивания. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C, затем промывали один раз буфером для окрашивания. Клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания. Данные собирали с применением проточного цитометра MACSQuant® (Miltenyi Biotec) и анализировали с применением программы анализа FlowJo.

Антитела были использованы CD11b, CD33, CD177, CD16, CD15, CD14, CD20, HLADR, CD3, CD4, CD8, CD127, CD69, и FOXP3 антитела (Biolegend, San Diego, CA). APC-конъюгированные мышинные анти-человеческие VISTA (клон GG8) были произведены ImmuNext (Lebanon, NH).

Выводы.

Экспрессия VISTA на клетках периферической крови здорового человека.

Цельная кровь и мононуклеары периферической крови анализировали на экспрессию VISTA с применением многоцветной проточной цитометрии. Как показано на фиг. 15A и 15B, наиболее высокие уровни экспрессии VISTA были обнаружены на моноцитах, затем на нейтрофилах. Как $CD4^+$ так и $CD8^+$ Т-клетки экспрессировали низкий уровень VISTA, как показано на фиг. 13C и 13D.

Экспрессия VISTA на клетках периферической крови пациентов, больных раком.

Как показано на фиг. 14A-14C, были проанализированы мононуклеары периферической крови (PBMCs) от пациентов с раком легких. На фиг. 14A представлен показательный плот, показывающий анализ $CD14^+$ моноцитов и $CD15^+$ супрессирующих клеток миелоидного происхождения (MDSCs). Результаты показали, что фенотипически $CD15^+$ клетки представляют собой MDSCs нейтрофильного происхождения. Кроме того, данные клетки отсутствуют в образцах крови здорового человека. На фиг. 14B представлена показательная гистограмма экспрессии VISTA на производных моноцитов здоровых людей и пациентов, больных раком, указывающая на более высокие уровни экспрессии VISTA на клетках пациента, больного раком, по сравнению со здоровыми людьми. Аналогично высокие уровни VISTA были обнаружены на MDSCs пациентов, больных раком, как показано на фиг. 14C. На фиг. 15A представлен показательный плот FACS, показывающий присутствие MDSCs нейтрофильного происхождения в крови пациентов, болеющих раком толстой кишки. На фиг. 15B и 15C представлены показательные гистограммы, показывающие наиболее высокие уровни экспрессии VISTA на моноцитах пациентов, больных раком, по сравнению с образцами донорской крови здоровых людей. Экспрессия VISTA на клетках периферической крови яванского макака Как показано на фиг. 16A и 16B, анализ проточной цитометрии цельной крови макака показал профиль экспрессии гена VISTA схожий с человеческими клетками. Как моноциты, так и нейтрофилы экспрессировали наиболее высокие уровни VISTA по сравнению с $CD4^+$ (фиг. 16C) и $CD8^+$ (фиг. 16D) Т-клетками.

Пример 3. Экспрессия VISTA в хеме злокачественных клеточных линий на уровне РНК и на уровне белка.

Поскольку VISTA экспрессируется в хеме злокачественных образований, анти-VISTA антитела потенциально могут нацеливаться на злокачественные клетки для разрушения, а также блокирования VISTA и вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

Данные включают анализ секвенирования РНК (RNAseq) ~140 хеме злокачественных клеточных линий (некоторые клеточные линии повторяются в анализе).

Данные показаны на фиг. 17.

Значения RNAseq числятся как значения FPKM (фрагментов на тысячу оснований экзона на миллион картированных фрагментов).

По существу это означает, что, все прочтения, встречающиеся в экзонных участках гена, подсчитывались и нормализовались как по длине гена, так и по общему количеству прочтений на образец (учитывая различия между образцами). Предельное значение составляет 1; выше 1 является положительным для экспрессии VISTA (на уровне РНК), ниже 1 является негативным для экспрессии VISTA.

Результаты показали, что многие клеточные линии являются положительными на уровне РНК, прежде всего остроуго миелоидного лейкоза и хронического миелоидного лейкоза. Это можно было ожи-

дать, поскольку VISTA экспрессировался в наиболее высоких уровнях в нормальных миелоидных клетках, и поскольку его функцией является предположительно ослабление иммунного ответа, включая противоопухолевые иммунные ответы.

Пример 4. Выработка моноклональных антител против VISTA.

Пэннинг фага.

Двадцать четыре эксперимента пэннинга фага осуществляли для обогащения фага, реактивного к VISTA-His яванского макака. Белок VISTA яванского макака применяли для данных экспериментов, поскольку он показал лучшую конъюгацию с биотином, чем человеческие белки VISTA. Для определения успешности фаговых экспериментов, пул фагов от отдельных этапов пэннинга добавляли в планшеты с нейтравидином, покрытые биотинилированными VISTA-His яванского макака и определяли с HRP-конъюгированным анти-M13 антителом. Отдельные колонии отбирали из этапов фаговой селекции и белки Fabs получали в 96-луночных планшетах.

Супернатанты экспрессированных Fab анализировали на связывание с биотинилированными VISTA-His яванского макака. Это привело к более чем 200 попаданий.

VH и VL участки от Fab пластин амплифицировали, предоставленные для секвенирования ДНК и экспортировали как FASTA файлы. При выборе клонов, которые должны быть преобразованы и исследоваться как MABs, клоны отбирали на основе разнообразия последовательности, а также имеющих ограниченные риски посттрансляционных модификаций и как можно меньше гидрофобных остатков, как это возможно.

VH и VL от фаговых клонов были субклонированы в экспрессионные векторы IgG1/каппа млекопитающих и трансфецированы в клетки HEK293. Антитела очищали на аффинной смоле на основе белка A Sepharose Fast Flow. Концентрацию MABs фага определяли путем количественного твердофазного ИФА с применением измерений Nanodrop. Панель антител экспрессировалась на высоких уровнях. Анализ SDS-PAGE показал сохранность каждого экспрессированного варианта антитела. Совпадающее созревание антител фага было сделано путем амплификации VH доменов из смеси поликлональных антител из последнего этапа пэннинга для клонирования в фаговые векторы, которые имели разнообразие в VL. Это привело к обогащению пула, который был отобранным с дополнительным разнообразием в VL. Фаги отбирали через 1-2 этапа строгого пэннинга с вероятностью определения очень высокой аффинности связывания с VISTA ECD His белка. Твердофазный ИФА моноклональных Fab проводили для определения достижения созревания. Данные твердофазного ИФА и экспрессии были нормализованы к референсному клону приравненному к 100% от первичного эксперимента пэннинга и аффинность созревших клонов с наиболее высоким сигналом связывания с антигеном VISTA яванского макака, чем референсный клон была определена. Данный процесс вырабатывает несколько клонов, которые показали до 200% связывания, когда скрининг при низкой концентрации антигена (1 нМ), клоны с наибольшей аффинностью секвенировали и получали как MABs.

Получение гибридомы.

Одна группа мышей BALB/cAnNCr1 получила одно внутрибрюшинное (IP) введение 50 мкг Hu VISTA-Ig рекомбинантного белка (Sino), эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда последующие две недели после одного IP введения 50 мкг Hu VISTA-Ig рекомбинантного белка, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда. Через две недели мыши получали одно IP введение 50 мкг VISTA-Fc рекомбинантного белка яванского макака, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда. Все мыши получали последнее введение 25 мкг человеческого и 25 мкг яванского макака VISTA в PBS в основание хвоста, за пять дней до получения селезенки для слияния. Другая группа мышей BALB/cAnNCr1 получала одно IP введение 50 мкг человеческих (Hu) VISTA-His рекомбинантного белка, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда. Через две недели мыши получали одно IP введение 50 мкг Hu VISTA-His рекомбинантного белка, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда. Через две недели мыши получали одно IP введение 50 мкг VISTA-His рекомбинантного белка яванского макака, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда. Через две недели все мыши получали последнее введение 25 мкг Hu VISTA-His и 25 мкг VISTA-His яванского макака в PBS, за три дня до получения селезенки для слияния.

В день слияния мышей умерщвляли с помощью асфиксии CO₂, селезенки удаляли и помещали в 10 мл холодного фосфатно-солевой буферный раствор. Приготовляли суспензию отдельных клеток спленоцитов путем измельчения селезенки через мелкое сито небольшим пестиком и промывали PBS при комнатной температуре. Клетки промывали один раз в PBS и подвергали лизису RBC. Вкратце клетки ресуспендировали в 3 мл лизирующего буфера RBC (Sigma #R7757) на каждую селезенку и помещали на лед в течение 5 мин. Клетки снова промывали один раз в PBS при комнатной температуре и метили для магнитной сортировки. В соответствии с инструкциями, клетки метили с анти-мышинными Thy1.2, анти-мышинными CD11b и анти-мышинными IgM магнитными микроносителями (Miltenyi Biotec #130-049-101, 130-049-601 и 130-047-301 соответственно), затем сортировали с применением MS колонки с Midi MACS. Фракции негативных клеток (фракции позитивных клеток сбрасывали) были слиты с FO клетками. Слияние осуществляли в соотношении 1:1 миеломные клетки мыши к жизнеспособным клеткам селезенки. Вкратце клетки селезенки и миеломные клетки смешивали, осаждали и промывали один раз в 50 мл PBS. Осадок ресуспендировали с 1 мл раствора пропиленгликоля (PEG) (2 г PEG молекулярной

массой 4000, 2 мл DMEM, 0.4 мл DMSO) на 10^6 спленоцитов при 37°C в течение 30 с. Клетку/смесь для слияния затем погружали в 37°C водяную баню в течение приблизительно 60 с с легким перемешиванием. Реакцию слияния останавливали добавлением 37°C DMEM в течение 1 мин. Слившиеся клетки оставляли в покое в течение 5 мин при комнатной температуре и затем центрифугировали при $150\times g$ в течение 5 мин. Клетки затем ресуспендировали в среде E-HAT (MediumE (StemCell Technologies cat #03805), содержащей HAT (Sigma cat #H0262), и засеивали в 96-луночный плоскодонный полистирольный планшет для тканевых культур (Corning #3997).

ИФА с захватом применялся для скрининга гибридомных супернатантов на специфические антитела для VISTA яванского макака. Вкратце планшеты (Nunc-Maxisorp #446612) покрывали при 4 мкг/мл в течение по меньшей мере 60 мин с козьими анти-мышинными IgG (Fc) антителами (Jackson #115-006-071) в буфере для сорбции (Thermo 28382). Планшеты блокировали с 200 мкл/лунка 0.4% (w/v) бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали один раз и добавляли 50 мкл/лунка гибридомного супернатанта и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин. Планшеты промывали один раз и добавляли 50 мкл/лунка 0.1 мкг/мл VISTA-huIg яванского макака и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшеты промывали один раз и добавляли в планшеты 1:40,000 стрептавидин HRP (Jackson 016-030-084) в 0.4% BSA/PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза и затем проявляли с применением 100 мкл/лунка TMB Turbo субстрата (Thermo Scientific 34022) инкубированием приблизительно в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали с применением 25 мкл/лунка 4N серной кислоты и измеряли оптическую плотность при 450 нм с применением автоматизированной пластины спектрофотометра. Пятнадцать первичных попаданий отбирали для субклонирования с помощью предельного разведения и скринировали в том же самом первичном формате скрининга. Все реактивные гибридомные клеточные линии VISTA яванского макака перекрестно скринировали с применением человеческих VISTA-Ig для определения перекрестной специфичности. Вкратце планшеты (Nunc-Maxisorp #446612) покрывали при 4 мкг/мл с козьими анти-мышинными Fc (Jackson #115-006-071) в 0.1 М натриево-карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9.4 (Pierce 28382 VupH™) O/N при 4°C . Не промывая, лунки блокировали с 200 мкл блокирующего (0.4% BSA (Sigma) (w/v) в PBS (Invitrogen)) в течение всей ночи при 4°C . После удаляли блокирующий раствор, неразведенные гибридомные супернатанты инкубировали на покрытых планшетах в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали один раз с PBST (0.02% Tween 20 (Sigma) (w/v) в PBS), и затем инкубировали в течение 30 мин с Hi VISTA-Ig, разведенными до 100 нг/мл в блоке. Планшеты промывали один раз с и зондировали с козьими античеловеческими-Fc-HRP (Jackson #109-036-098), разведенными 1:10,000 в блоке в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты вновь промывали и затем проявляли с применением 100 мкл/лунка TMB Turbo субстрата (Thermo Scientific 34022) инкубированием приблизительно 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали с применением 25 мкл/лунка 4N серной кислоты и измеряли оптическую плотность при 450 нм с применением автоматизированной пластины спектрофотометра.

Гибридомы, которые показывали реакцию как на человеческие VISTA, так и на VISTA яванского макака, имели три клонированных последовательности V участка антитела. Гибридомные клетки готовили до реакции обратной транскриптазы (RT) с набором Invitrogen's Superscript III cells Direct cDNA System. Вкратце культуральную среду сбрасывали и планшет помещали на лед и ресуспендировали в 200 мкл холодного PBS. Сорок микролитров переносили в MicroAmp fast 96-луночный реакционный ПЦР планшет и планшет помещали на холодную металлическую пластинку-основание, запечатывали полимерной пленкой и центрифугировали при 700 об/мин в течение 3 мин. PBS сбрасывали и к каждой лунке добавляли 10 мкл ресуспендирующего буфера и 1 мкл усилителя лизиса. Планшеты запечатывали и инкубировали при 75°C в течение 10 мин и хранили при -80°C .

Для реакции RT каждая лунка содержала 5 мкл воды, 1.6 мкл $10\times$ DNase буфера, 1.2 мкл 50 мМ EDTA, 2 мкл Oligo(dT)20 (50 мМ) и 1 мкл 10 мМ смеси dNTP. Планшет инкубировали при 70°C в течение 5 мин, с последующей инкубацией на льду в течение 2 мин, затем добавляли следующие реагенты в каждую лунку; 6 мкл 5X RT буфер, 1 мкл RNaseOUT™ (40 ед/мкл), 1 мкл Superscript™ III RT (200 ед/мкл) и 1 мкл 0.1 М DTT. Планшет запечатывали и помещали на предварительно нагретый до 50°C термоблок для реакций и инкубировали при 50°C в течение 50 мин, с последующей инактивацией (5 мин инкубировали при 85°C). Реакцию охлаждали на льду и одноцепочечную кДНК хранили при -80°C до дальнейшего применения. Для амплификации V участка, приготовили 20 мкл реакционной смеси ПЦР. Каждая лунка содержала 16.2 мкл воды, 2.0 мкл $10\times$ реакционного буфера ПЦР, 0.8 мкл MgSO_4 (50 мМ), 0.4 мкл 10 мМ dNTP, смесь 0.15 мкл 100 мкм прямых праймеров 0.05 мкл 100 мкм обратных праймеров, 0.2 мкл HiFi Tag фермент. кДНК, полученная, как описано выше, переносили (2 мкл/лунка) к компонентам смеси ПЦР, планшет запечатывали и проводили реакцию амплификации; для VH программа была (i) 94°C в течение 1 мин (ii) 94°C в течение 15 с (iii) 55°C в течение 30 с (iv) 68°C в течение 1 мин. Стадии (ii-iv) повторяли в общей сложности 35 циклов с последующей конечной элонгацией при 68°C в течение 3 мин. Для VL программа была (i) 94°C в течение 1 мин (ii) 94°C в течение 15 с (iii) 55°C в течение 30 с (iv)

65°C в течение 30 с, (v) 68°C в течение 1 мин. Стадии (ii-v) повторяли в общей сложности 35 циклов с последующей конечной элонгацией при 68°C в течение 3 мин.

Прямые праймеры были предварительно смешаны и такую смесь применяли в соотношении 3:1 к обратным праймерам. Продукты ПЦР проверяли на агарозном геле. Реакции подготавливали для клонирования инфузией путем добавления усилителя (набор In-Fusion HC Cloning Kit, cat #639650, Clontech). Пять микролитров реакции ПЦР переносили на планшет ПЦР с последующим переносом 2 мкл усилителя/лунка. Планшет запечатывали и инкубировали в термоблоке для реакций (15 мин при 37°C и 15 мин при 80°C). Вектор доставки (vDR243 или vDR301) приготавливали путем расщепления Esp3I; (1.5 мкг вектора был расщеплен в 3 мкл Tango буфера, 2 л Esp3I и воды в 30 мкл реакции при 37°C в течение 2 ч).

Для клонирования инфузией, 2 мкл продуктов ПЦР, обработанных усилителем, смешивали с 100 нг расщепленного вектора Esp3I и 2 мкл 5× фермента для инфузии (Clontech). Реакцию проводили в формате 96-луночного ПЦР планшета. Планшет инкубировали в течение 15 мин при 50°C на приборе ПЦР и Stella компетентные клетки были трансформированы с помощью теплового шока в течение 40 секунд при 42°C без встряхивания и наносили на планшеты с агаром LB с подобранным антибиотиком и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день колонии собирали в 96-луночный планшет с глубокими лунками, содержащие среду LB/карбенициллин и выращивали в течение ночи при 37°C. Замороженные продукты изготавливали из ночной культуры, смешанной в равных объемах с 30% мас./об. глицерином. V участки секвенировали с применением праймера секвенирования SPF0052. Последовательности были проанализированы, была выбрана одна положительная лунка на VH и VL гибридомы, вновь располагали в новые планшеты и выращивали в течение ночи в среде, обогащенной ампициллином. Клонирование затем было минипрепаратом ДНК (miniprep DNA) для переноса в небольшом количестве в 96-луночный планшет. Выбранные сорок восемь гибридных последовательностей мыши для обеих тяжелой и легкой цепей были адаптированы человеческим каркасом с применением внутреннего программного обеспечения. Один человеческий каркас отбирали для каждого мышинного VH или VL. V участок DNA последовательностей получали посредством обратного перевода. Синтетические участки ДНК, соответствующие аминокислотным последовательностям HFA заказывали у Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Клонирование осуществляли в предварительно вырезанные vDR149 и vDR157, человеческие IgG1 и человеческие каппа, соответственно. Применяли наборы Qiagen Endo-free Maxi-prep kits для приготовления ДНК. Культуру Expi293 (100 мл) применяли для экспрессии такой панели антител.

Пример 5. Протокол для анализа *in vitro* Т-клеточной супрессии человеческих VISTA-IG T.

Мышечные клетки A20 были стабильно трансфицированы с либо GFP или человеческими VISTA. Их инкубировали с пептидом овалбумина и с DO11.10 Т-клетками. Экспрессию CD25 Т-клетками измеряли через 24 ч после начала инкубации. A20-huVISTA клетки подавляют экспрессию CD25 с помощью Т-клеток, но эти данные значительно восстанавливали с помощью инкубации с VSTB95 (фиг. 18).

Пример 6. Адаптация человеческих каркасных участков анти-VISTA антител.

Последовательности мышинной гибридомы для обеих тяжелой и легкой цепей человеческого каркаса адаптировали с помощью CDR-пересадки (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986) с применением внутреннего программного обеспечения. Программа очерчивала последовательности V участка гипервариабельных участков (CDRs) в соответствии с определениями Kabat (Wu, T.T. & Kabat, E.A. (1970), J. Exp. Med., 132, 211-50) и сравнивала каркасные участки с генами человеческой зародышевой линии с применением Blast. Человеческую зародышевую линию с наиболее высокой идентичностью последовательности к мышинным каркасам отбирали в качестве гена-акцептора для адаптации человеческого каркаса (HFA). В некоторых случаях, близкородственные гены человеческой зародышевой линии отбирали вместо, исходя из предшествующего опыта, с хорошо экспрессируемыми человеческими каркасами. ДНК последовательности для человеческих каркасов отбирали для каждого из V участков мышинных VH или VL получали посредством обратного перевода. Синтетические участки ДНК, соответствующие аминокислотным последовательностям HFA получили от Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Клонирование выполняли в человеческие IgG1 и человеческие каппа, соответственно.

Пример 7. Конструкции анти-VISTA антител.

Плазмида и информационная последовательность для молекул для развития клеточной линии: плазмидные конструкции были созданы для анти-VISTA антител, имеющих вариабельные участки VSTB112 и константные участки IgG1K (VSTB174, новый номер в связи с аллотипическим изменением в константном участке), константный участок IgG2сигма (VSTB140) или протеаза-резистентный константный участок IgG1 (VSTB149).

Lonza векторы.

Система экспрессионного вектора pEE6.4 и pEE12.4 яичника китайского хомька (CHO) (Lonza Biologics, PLC) была создана в Biologics Research (BR) и Pharmaceutical Development & Manufacturing Sciences (PDMS) в качестве первичной экспрессионной системы для получения терапевтических mAbs в экспрессионной клеточной линии млекопитающих. Каждый вектор включает промотор человеческого цитомегаловируса (huCMV-MIE) для управления экспрессией тяжелой цепи (HC) или легкой цепи (LC) и включает ген, устойчивый к ампициллину. Вектор pEE12.4 также включает ген, кодирующий фермент глутаминсинтазу (GS). Условия роста, которые требуют активность глутаминсинтазы, устанавлива-

ют селективное давление на клетки для сохранения экспрессионного вектора (GS Gene Expression System Manual Version 4.0). pEE6.4 применяли для клонирования гена HC, а pEE12.4 для клонирования гена LC в качестве сигнальных векторов гена. Двойной плазмидный ген Lonza создавали из этих двух отдельных векторов генов Lonza.

Аминокислотная последовательность вариабельных участков тяжелой цепи выбранных VISTA mAbs.

> VSTB112 тяжелая цепь (SEQ ID NO:37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG
IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSYGWSYEFDY
WGQGLTVTVSS

> VSTB50 тяжелая цепь (SEQ ID NO:38)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLNWVRQAPGQGLEWMG
WINPYTGEPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAREGYGNYIFPY
WGQGLTVTVSS

> VSTB53 тяжелая цепь (SEQ ID NO:39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYTIHWVRQAPGQGLEWMG
YIIPSSGYSEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGAYDDYYDY
YAMDYWGQGLTVTVSS

> VSTB95 тяжелая цепь (SEQ ID NO:40)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYGMSWVRQAPGKGLEWVAS
IISGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIYDHDGDYYA
MDYWGQGTITVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельных участков легкой цепи выбранных VISTA mAbs.

>VSTB50 легкая цепь (SEQ ID NO:41)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASESVDTYANSLMHWYLQKPGQPQLLI
YRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQTNEPRTFGQGTKLEIK

>VSTB53 легкая цепь (SEQ ID NO:42)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPTFGQGTKLEI
K

>VSTB95 легкая цепь (SEQ ID NO:43)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKLEI
K

>VSTB112 легкая цепь (SEQ ID NO:44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDTRLNHWYQQKPGKAPKLLIYSASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSAYNPITFGQGTKVEIK

>VSTB116 легкая цепь (SEQ ID NO:45)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINTNLNHWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQARDTPIITFGQGTKVEIK

Пример 8. Твердофазный ИФА и FACS скрининг анти-VISTA антител.

Данные эксперименты проводили для определения способности полученных антител связываться с человеческим белком VISTA или белком VISTA яванского макака в твердофазном ИФА, а также для определения, с применением FACS скрининга, способности антител связываться с белком VISTA на поверхности K562 клеток (человеческая миелогенная лейкозная клеточная линия), экспрессирующих человеческие белки VISTA или белки VISTA яванского макака.

Способы.

Краткое описание способа твердофазного ИФА.

Планшеты покрывали в течение ночи при 4°C с 1 мкг/мл SB0361 (человеческими) или SB0361 (супо (яванского макака)) белками, которые представляют собой внеклеточные домены VISTA от соответст-

вующих видов. Антитела разводили до концентрации 1 мкг/мл в качестве исходной концентрации с 1:4 поэтапными разведениями в общей сложности 4 концентраций и инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 2 ч. Мышиные анти-человеческие IgG1-HRP (пероксидаза хрена) применяли для обнаружения и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Все промывания осуществляли с применением PBS-Tween (0.05%).

Краткое описание способа FACS.

2×10^5 K562-G8 (человеческих) или K562-C7 (яванского макака) клеток окрашивали с 5 мкг/мл каждым исследуемым антителом и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Козье анти-человеческое IgG1-PE (фикоэритрин) антитело применяли в качестве второго идентифицирующего антитела при концентрации 5 мкг/мл. Клетки запускали на BD Fortessa и анализировали с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) на MFI (средняя интенсивность флюоресценции) для живой популяции.

Данные анализа/результаты.

Для каждого антитела, была дана субъективная оценка (Да/Нет) в отношении любого антитела, сильно связанного или нет для обоих анализов твердофазного ИФА (ELISA) и FACS для каждого из 4-х исследований. Если антитело давало результат "Нет" для связывания в любом исследовании, его повторяли для подтверждения того, что он был отрицательным. Результаты показаны в табл. 7 ниже и фиг. 19A-19F и 20A-20F.

Таблица 7

Код INX	Hu ELISA	Cyno ELISA	Hu FACS	Cyno FACS
1	Y	Y	Y	Y
2	Y	Y	Y	Y
3	Y	Y	Y	Y
4	Y	Y	Y	Y
5	Y	Y	Y	Y
6	Y	Y	Y	Y
7	Y	Y	Y	Y
8	Y	Y	Y	Y
9	Y	Y	Y	Y
10	Y	Y	Y	Y
11	N	N	N	N
12	Y	Y	Y	Y
14	Y	Y	Y	Y
16	Y	Y	Y	Y
17	Y	Y	Y	Y
18	Y	Y	Y	Y
19	Y	Y	Y	Y
20	Y	Y	Y	Y
21	Y	Y	Y	Y

22	Y	Y	Y	Y
23	N	N	N	N
24	N	N	N	N
25	Y	Y	Y	Y
26	N	Y	N	Y
28	Y	Y	Y	Y
30	N	N	N	N
31	N	N	N	N
32	N	N	N	N
33	Y	Y	Y	Y
34	Y	Y	Y	Y
35	Y	Y	Y	Y
36	Y	Y	Y	Y
37	Y	Y	Y	Y
38	Y	Y	Y	Y
39	Y	Y	N	N
40	Y	Y	Y	Y
41	Y	Y	Y	Y
42	Y	Y	Y	Y
43	Y	Y	Y	Y
44	Y	Y	Y	Y
45	Y	Y	Y	Y
46	Y	Y	Y	Y
47	Y	Y	Y	Y
48	Y	Y	Y	Y
49	Y	Y	Y	Y

Пример 9. Результаты скрининга анти-человеческих VISTA антител с применением реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) и анализа активации энтеротоксина в *Staphylococcus* (SEB).

Целью данного исследования было предоставить данные, подтверждающие идентификацию множественных функциональных α -VISTA антител, которые усиливают клеточные иммунные ответы в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), а также исследовании активации энтеротоксина в *Staphylococcus* (SEB). Реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR) представляет собой стандартный иммунологический анализ, который зависит от МНС класса I и II, несоответствующего для управления алогенным Т-клеточным ответом. Мононуклеары периферической крови выделяли из двух несоответствующих индивидуумов, инкубировали вместе, и как результат таких несопадений происходила пролиферация и выработка цитокинов.

Материалы и способы.

10% АВ среду получали смешиванием 500 мл RPMI с 50 мл человеческой сыворотки АВ, 5 мл пенициллина/стрептомицина (10,000 ед./мл), 5 мл L-глутамин (100 \times) и 10 мл HEPES (1 M). Среду хранили не более чем 14 дней. 1 мКи меченный тритием тимидин получали разбавлением 0.2 мл исходного тимидина (1 мКи/мл) в 9.8 мл RPMI.

Растворимые VISTA антитела разбавляли до 20 мкг/мл в 10% АВ сывороточной среде. 100 мкл соответствующих растворов антител добавляли в соответствующие лунки 96-луночного планшета с U-образным дном (продукт Falcon #353077 или аналог). После были добавлены различные клеточные популяции, конечная концентрация составила 10 мкг/мл.

Выделение лейкоцитов.

Донорам было по меньшей мере 18 лет, как правило, здоровые люди и выбранные случайным образом из местного населения. Переносили донорскую кровь из изолированных пробирок в 50 мл конические. Наносили ниже 15 мл Фиколла 1077 на 25 мл крови осторожно, чтобы не перемешать с кровью. Клетки центрифугировали при 1250g в течение 25 мин при комнатной температуре без торможения. Лейкоциты выделяли на границе раздела фаз Фиколла и сыворотки и клетки разводили в 40 мл сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS). Клетки центрифугировали при 453g (1500 об/мин) в течение 10 мин при 4°C. Клетки ресуспендировали в 50 мл HBSS и подсчитывали путем переноса 500 мкл в отдельную пробирку.

Постановка реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) в 96-луночном планшете.

Определяли соответствующее количество "стимулирующих клеток" и "иммунокомпетентных клеток" необходимое для исследования, исходя из количества анализируемых образцов. Симулирующую популяцию высевали при 0.5×10^5 клеток/лунка и иммунокомпетентную популяцию высевали при 1.0×10^5 клеток/лунка в 96-луночном планшете с U-образным дном. Все условия должны были осуществляться в трех экземплярах. Соответствующее количество "стимулирующих клеток" пипетировали в новую коническую пробирку и центрифугировали, как описывали ранее. Клетки ресуспендировали в 10 мл и облучали 4000 рад. Клетки центрифугировали, как описывали ранее, и ресуспендировали при концен-

трации 1×10^6 /мл в 10% АВ сывороточной среде и добавляли 50 мкл в соответствующие лунки. Выделяли необходимое количество иммунокомпетентных клеток и центрифугировали, как описывали ранее, и ресуспендировали при концентрации 2×10^6 /мл в 10% АВ сывороточной среде и добавляли 50 мкл в соответствующие лунки. Клетки инкубировали в течение 5 дней при 37°C и 5% CO₂. На пятый день удаляли 30 мкл супернатанта для исследования на выработку интерферона-гамма (IFN- γ). На пятый день добавляли 25 мкл 40 мКи/мл раствора меченого тритием тимидина в каждую лунку и инкубировали в течение 8 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки переносили в 96-луночный микро-стицилляционный планшет в соответствии с инструкциями изготовителя. Подсчитывали с применением микро-стицилляционного детектора в соответствии с инструкциями изготовителя. Концентрацию IFN- γ определяли с помощью ELISA (eBio-science cat #88-7316-88) с применением протокола изготовителя. Данные анализа: Подсчитывали среднее число импульсов в минуту (CPM) или концентрацию IFN- γ для необработанных лунок. Подсчитывали среднюю величину CPM или IFN- γ для каждой исследуемой группы. Логарифмическое преобразование Log₁₀ набора данных. С применением 12 MLR кратных-баллов для каждого соединения вычисляли среднюю величину для набора из 12 исследуемых групп каждого соединения средний балл для 12 экспериментов = $\frac{\sum[(\log_{10}(\text{средняя величина CPM в трех экземпляров для исследуемого соединения})) - (\log_{10}(\text{средняя величина CPM в трех экземпляров без лечения}))]}{12}$.

Допустимые нормы.

Все реагенты исследования и соответствующие контроли были исследованы на наличие эндотоксина до проведения исследования и имели уровни <0.1 EU/мг. Иммунокомпетентные клетки сами по себе имели в среднем уровень CPM ниже 700 CPM, указывающий, что клетки были в состоянии покоя, когда инкубировали в одиночку. CPM для группы MLR составил по меньшей мере в 2 раза выше, чем CPM для иммунокомпетентных клеток, инкубируемых в одиночку, указывая, что реакция произошла и что доноры являлись несоответствующими. Все исследования MLR включали в себя негативный контроль человеческого IgG1 белка. Результаты негативного контроля человеческого IgG1 не значительно отличались от необработанных образцов, основанные на применении критерия Стьюдента.

Скрининг анти-VISTA антител в MLR.

Предварительно проводили скрининг всех соединений. Перед выполнением MLR с анти-VISTA антител, посредством анализа FACS подтверждали связывания антитела также с клетками, связанными с VISTA, и, посредством твердофазного ИФА, белком VISTA. Антитела S26 (VSTB77), S30 (VSTB86), S31 (VSTB88), S32 (VSTB90) и S39 (VSTB74) не удовлетворили такой предварительный скрининг, но остались исследоваться в анализе. С целью первичного скрининга, все антитела исследовали при 10 мкг/мл в MLR с пролиферацией и измеряли параметры IFN- γ (фиг. 21A-21D и 22A, 22B).

Выбор шести лидирующих антител.

Для первичного скрининга шесть кандидатов были отобраны для дальнейшего анализа: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) и VSTB60 (S47).

Исследования разбавления шести кандидатов в MLR: поправки протокола.

Протокол идентичен, как описано выше, с поправками, что антитела были разбавлены до следующих концентраций: 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 и 0 мкг/мл.

Определение значений IC₅₀.

Грубые показатели CPM и концентрации IFN- γ применяли для определения IC₅₀ для каждого из антител. Вычисления IC₅₀ определяли посредством применения программы "EZ-R stats". Шесть отдельных иммунокомпетентных клеток применяли для определения значений IC₅₀. Отдельные значения CPM и концентрации IFN- γ в MLR с подбором дозы лидирующих кандидатов.

Таблица 8

Значения IC₅₀ для обоих CPM и IFN- γ в MLR

	VSTB112 (S2)	VSTB116 (S5)	VSTB95 (S16)	VSTB50 (S41)	VSTB53 (S43)	VSTB60 (S47)
CPM	-0.67	-0.78	-0.54	-0.12	-0.33	0.02
Гамма	-0.42	-0.16	0.22	0.06	0.27	0.4

** Значения представлены в log₁₀ концентраций антител.

Вывод.

Первичный скрининг показал, что множественные специфические VISTA антитела способны усиливать клеточный иммунный ответ MLR. Антитела затем были ранжированы исходя из эффективности и изменчивости и, на основе этих результатов, VSTB112, VSTB116, VSTB95, VSTB50, VSTB53 и VSTB60 были выбраны для оценки в экспериментах подбора дозы. VSTB60 индуцировали более слабый ответ, чем остальные пять антител в экспериментах подбора дозы.

Анализ активации энтеротоксина B Staphylococcus (SEB).

SEB представляет собой бактериальный супер-антиген, который вызывает активацию специфических V β ⁺ T-клеток. Выделяли мононуклеары периферической крови и инкубировали с антигеном SEB в культуре, которая индуцировала устойчивую выработку цитокина. Такой анализ проводили на пяти лидирующих кандидатах.

Получение 10% АВ среды, приготовление 1 мКи меченного тритием тимидина, приготовление раствора VISTA антител, и выделение лейкоцитов осуществляли, как предварительно описано выше, в MLR.

Подготовка SEB 96-луночного планшета.

Определяли соответствующее количество иммунокомпетентных клеток, необходимых для анализа, исходя из количества анализируемых образцов. Популяцию иммунокомпетентных клеток высевали при 2.0×10^5 клеток/лунка в 96-луночный планшет с U-образным дном. Все условия должны были осуществляться в трех экземплярах. Клетки центрифугировали, как предварительно описывали выше, и ресуспендировали при концентрации 4×10^6 /мл в 10% АВ сывороточной среды и добавляли 50 мкл в соответствующие лунки. Добавляли 50 мкл 10% АВ сывороточной среды, содержащей SEB антиген при концентрации 40 нг/мл. В описанных экспериментах, SEB получали от Sigma Aldrich (cat #S0812). Конечная концентрация в лунке составляла 10 нг/мл. Клетки инкубировали в течение 3 дней при 37°C и 5% CO₂. На третий день удаляли 30 мкл супернатанта для анализа на выработку IFN-γ. Добавляли 25 мкл 1 мКи/мл раствора меченного тритием тимидина в каждую лунку и инкубировали в течение 8 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки переносили в 96-луночный микро-стинцилляционный планшет в соответствии с инструкциями производителя. Подсчитывали с применением микро-стинцилляционного детектора в соответствии с инструкциями изготовителя. Концентрацию IFN-γ определяли с помощью твердофазного ИФА (eBio-science cat #88-7316-88) с применением протокола изготовителя.

Протокол: анализ данных.

Подсчитывали среднее количество импульсов в минуту (CPM) или концентрацию IFN-γ для каждого антитела во всех концентрациях. Критерии приемлемости осуществляли, как предварительно описывали. Определение значений IC₅₀ осуществляли, как описано. Отдельные значения CPM и концентраций IFN-γ в SEB анализе подбора дозы лидирующих кандидатов.

Таблица 9

Значения IC₅₀ для обоих CPM и IFN-γ в SEB.

	VSTB112 (S2)	VSTB116 (S5)	VSTB95 (S16)	VSTB50 (S41)	VSTB53 (S43)	VSTB60 (S47)
CPM	-1.16	-1.44	-1.12	-0.74	-1.06	Не выполнено
Гамма	-1.24	-0.35	0.05	1.69	-1.05	Не выполнено

** Значения представлены в log₁₀ концентраций антител.

Выводы.

Специфические VISTA антитела усиливали выработку цитокинов и пролиферацию в зависимости от дозы в SEB анализе. Значения IC₅₀ от SEB исследования в целом были похожи на результаты исследований разбавления MLR.

Пример 10. Анализ эпитоп-специфической сортировки.

Способы.

ProteOn XPR36 систему (BioRad) применяли для осуществления эпитоп-связывающей сортировки. ProteOn GLC чипы (BioRad, cat #176-5011) покрывали двумя наборами из 6 моноклональных антител (mAbs), используя инструкции производителя для химического анализа амин-соединения (BioRad, cat #176-2410). Конкурирующие mAbs предварительно инкубировали в избытке (конечная концентрация 250 нМ) с человеческими VISTA (конечная концентрация 25 нМ) в течение 4 ч при комнатной температуре и 6 в то же время выполняли в отношении чипа, покрытого с панелями покрытых mAbs временной ассоциацией 4 мин с последующей диссоциацией в течение 5 мин. После каждого выполнения, чипы восстанавливали с 100 мМ фосфорной кислоты.

Анализ полученных данных вовлекал группировки всех сенсограмм с помощью лиганда и использования мастера выравнивания, который автоматически выполняет выравнивание X и Y оси, и артефакта удаления. Затем применяли к данным коррекцию Interspot.

Неконкурентные mAb определяли как имеющие сигнал связывания тот же или >A1 сигнал (связывание только с человеческим VISTA).

Конкурентные mAb определяли как имеющие сигнал связывания <<A1 сигнал (т.е. связывание только с человеческим VISTA).

Результаты.

В примере сенсограммы, показанном на фиг. 23, VSTB85 антитело покрывали на чипе Proteon SPR и выполняли предварительную инкубацию VISTA белка с указанными конкурентами в отношении чипа. VSTB50 представляет собой пример неконкурентного антитела, в качестве положительного ответа наблюдали, когда выполняли комплекс VISTA/VSTB50. GG8, VSTB49 и VSTB51 образовывали комплекса с VISTA без связывания с VSTB85, покрытыми на чипе, и были, по этой причине, квалифицированы как конкурирующие за тот же участок связывания на VISTA, как VSTB85.

Таблица 10

Образцы	Группа	Пробный набор #1: соединен с датчиком						Пробный набор #2: соединен с датчиком					
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
GG8	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB100.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB101.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB102.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB103.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB104.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB105.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB106.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB107.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB108.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB109.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB110.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB111.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB112.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB113.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB114.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB115.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB116.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB49.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB51.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB53.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB59.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB65.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB67.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB70.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB81.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB92.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB95.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB97.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB98.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB99.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB50.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB54.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB56.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB60.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB63.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB66.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB73.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB76.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB78.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB84.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB85.001	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	I	Y
VSTB74.001	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
IE8	5	Y	I	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y

mAb, иммобилизованные на датчике.

Y = есть конкуренция (сигнал << чем A1 - человеческие VISTA только).

N = нет конкуренции (сигнал > чем A1 - человеческие VISTA только).

I = не определен (сигнал похож на A1 - человеческие VISTA только).

Пример 11. Определение аффинности протеона.

Антитела были захвачены на чипах ProteOn с применением покрытых анти-IgG Fc поверхностей. Антитела исследовали на связывание с человеческими и яванского макака (супо) внеклеточными доменами (ECDs) VISTA при концентрации белков VISTA в диапазоне от 0.39 до 100 нМ. Антигены позволяли связываться/соединяться с чипами, покрытыми антителами в течение 4 мин, после чего наблюдали диссоциацию в течение 30 мин. Чипы восстанавливали, обрабатывая дважды с 100 мМ фосфорной кислоты в течение 18 с. Все эксперименты проводили при 25°C и данные были пригодными для 1:1 модели связывания Ленгмюра.

Пример 12. Влияние лечения анти-VISTA в мышинной модели рака мочевого пузыря MB49.

Способы.

C57B1/6 мышам вводили MB49 опухолевые клетки. После того как опухоли развились, начинали лечение анти-VISTA. Рост опухоли затем контролировали 3 раза в неделю. Мышей умерщвляли в соответствии с правилами IACUC, после того как опухоли достигали 15 мм в любом измерении.

Для каждого эксперимента замороженный флакон MB49 клеток размораживали и выращивали в RPMI 1640 (+L-Glut) с 10% сывороткой и антибиотиками пенициллин/стрептомицин. После трех дней в культуре, клетки собирали с применением StemPro Accutase и ресуспендировали в RPMI при концентрации 5×10^6 клеток/мл и вводили 50 мкл на мышь.

Мышей C57B1/6 женского пола возрастом 6-8 недель приобретали у National Cancer Institute. По прибытии им давали акклиматизироваться в течение одного дня до того, как им выбривали правый бок и прокалывали их хвосты. Спустя три-пять дней им вводили.

Введение опухоли (внутрикожно).

Мышам вводили внутрикожно (i.d.) в их выбритый бок 50 мкл MB49 клеточную суспензию (~250,000 клеток). Контроль роста опухоли.

Рост опухоли измеряли с применением, во-первых электронных измерителей по самому широкому объему (L) и во-вторых под углом 90° к первому измерению (W). Объем опухоли определяли следующим образом:

$$\text{Объем} = (L^2 * W^2) / 2$$

Опухоль считали созданной, когда она достигает ~5 мм в диаметре (~60 мм³ объема). После того как создали, начинали лечение. Рост опухоли измеряли три раза в неделю в процессе лечения и до прекращения эксперимента.

Лечение анти-VISTA.

Химерные 13F3-mIgG2a моноклональные антитела вводили внутрибрюшинно в 10 мг/кг. Протокол иммунизации был три раза в неделю в течение четырех недель.

Умерщвление мышей.

В соответствии с правилами IACUC, животных умерщвляли при достижении их опухолей 15 мм в самом длинном измерении.

Анализ эффективности.

Объемы опухолей мышей анализировали с применением Excel для обработки данных и GraphPad Prism для построения графиков.

Статистический анализ проводили с применением макроса для R статистических расчетов программного обеспечения.

Экспериментальная конструкция показана на фиг. 24.

Результаты.

Ch13F3-mIgG2a обработка мышей женского пола приводит к полному отторжению опухоли (CR) у 70% животных и частичной ремиссии (PR) у 30% (n=7) (табл. 13 и фиг. 25B). В отличие от этого, все контрольные мыши, получавшие лечение mIgG2a, показали прогрессивное развитие опухолей (6/6) (фиг. 25A). Данные показали, что лечение анти-VISTA могло иметь сильное воздействие на рост опухоли.

Таблица 11

Полная ремиссия (CR) по сравнению с частичной ремиссией (PR)

	13F3 IgG2a (n=7) женского пола
CR	5
PR	2 вплоть до 32

Последовательность человеческих VISTA показана на фиг. 26 и 27, на основе материалов Wang et al., 2011, выше, содержание которых включено посредством ссылки в настоящее описание в полном объеме.

Пример 13. Картирование эпитопов анти-VISTA антител с применением исследования водород/дейтериевого (H/D) обмена.

Для идентификации эпитопов для the VSTB50, 60, 95 и 112 на человеческих VISTA, масс-спектрометрию раствора на основе водород/дейтериевого обмена (HDX-MS) осуществляли с применением соответствующих Fabs. Процедуры для H/D обмена, применяемые для анализа Fab отклонения, ана-

логичны описанным ранее (Hamuro et al., J. Biomol. Techniques, 14:171-182, 2003; Horn et al., Biochemistry, 45:8488-8498, 2006) с некоторыми модификациями. Fabs приготавливали из IgGs с расщепленным папаином и захват белком А с применением набора Pierce Fab Preparation Kit (Thermo Scientific, cat #44985). Последовательность человеческого белка VISTA содержала шесть N-связанных участков гликозилирования. Для улучшения захвата последовательности, белок дегликозилировали с PNGase F. Дегликозилированный белок VISTA инкубировали в дейтерированном водном растворе в течение заданного времени, приводящее к включению дейтерия во взаимозаменяемым атомам водорода. Дейтерированный VISTA белок был в комплексе либо с Fab VSTB50, VSTB60, VSTB95 или VSTB112 в 46 мкл окиси дейтерия (D₂O) при 4°C в течение 30 с, 2, 10 и 60 мин. Обменную реакцию гасили низким pH и белки разрушали пепсином. Уровни дейтерия при определенных пептидах контролировали из сдвига массы на LC-MS. В качестве референсного контроля, белок VISTA обрабатывали подобным образом, за исключением того, что он был не в комплексе с молекулами Fab. Участки, связанные с Fab, вводили в те участки относительно защищенные от обмена, и, таким образом, содержащие более крупные фракции дейтерия, чем референсный белок VISTA. Приблизительно 94% белка может быть сопоставлен с конкретными пептидами.

Отклонения сопоставления раствора HDX-MS VISTA с VSTB50/VSTB60, и VSTB95/VSTB112 показаны на фиг. 28 сверху и снизу соответственно. Были идентифицированы две группы эпитопов. Анти-VISTA VSTB50 распознает тот же эпитоп, как делает VSTB60; VSTB95 связывается с другим эпитопом участка, как делает VSTB112 на VISTA. Анти-VISTA VSTB50 и 60 делят один и тот же эпитоп, который включает сегменты, ₁₀₃NLTLDSGL₁₁₁ (SEQ ID NO: 62) и ₁₃₆VQTGKDAPSNC₁₄₆ (SEQ ID NO: 63) (фиг. 28 сверху). Анти-VISTA VSTB95 и 112, по-видимому, нацелены на схожие эпитопы, включающие в себя сегменты ₂₇PVDKGHDVTF₃₆ (SEQ ID NO: 75) и ₅₄RRPIRNLTFQDL₆₅ (SEQ ID NO: 65) (фиг. 28 снизу). Есть два других сегмента, показывающие слабые отклонения по VSTB95 и 112, включающих остатки 39-52 и 118-134. Кроме того, уровни снижения не так сильны, как в предыдущих участках (27-36 и 54-65) в дифференциальной карте. Несмотря на то что один пептид 100TMR102, показывающий сильные отклонения по VSTB95 и 112, расположен на другой стороне поверхности VISTA, он является отдаленным от участков эпитопа, 27-36 и 54-65. Такие отклонения могут быть вызваны аллостерическим эффектом. Данные результаты HDX-MS определяют уровень эпитопов пептида для анти-VISTA антител. Там не было перекрывающихся участков эпитопа для таких двух групп эпитопа. Данные результаты согласовались с предыдущими данными конкурентной сортировки, в которых они не конкурировали друг с другом.

Пример 14. Определение структуры комплекса человеческих VISTA ECD:VSTB112 FAB с помощью белковой кристаллографии.

С целью определения структуры VISTA и для обозначения эпитопа и паратопа, определяющего взаимодействие между внеклеточным доменом VISTA (ECD) и Fab фрагментом лидирующего антитела VSTB112, комплекс кристаллизовали и определяли структуру при 1.85 Å разрешающей способности. Структуру ECD человеческих VISTA в комплексе с Fab фрагментом антитела VSTB112 определяли в попытке определения как структуры ECD самого VISTA, так и для определения эпитопа/паратопа для их взаимодействия. Структура обнаружила VISTA для принятия петли IgV с топологией цепи, аналогичной V α цепи TCR. В дополнение к конической дисульфидной связи, образующей мостик В и F нитями в задней и передней поверхностях β -сэндвича, структура показала ECD имеет две дополнительные дисульфидные связи, одна привязывает CC' петлю к переднему слою, а вторая между A' и G' нитями. Несмотря на то что кристаллические контакты между молекулами VISTA происходили, они были незначительными и не являются доказательством для димера VISTA ECDs на основе этой структуры. Эпитоп VSTB112 показан для включения частей VISTA BC, CC', и FG петли вместе с остатками переднего бета слоя (C'CFG) ближайших тех петель. Паратоп смещен в большей степени в сторону взаимодействий тяжелой цепи с CDR L3, делая минимальный контакт.

Эпитоп/паратоп, определяющий взаимодействие VISTA.

VSTB112 VSTB112 Fab закрывает площадь поверхности 1024.3 Å² при связывании VISTA ECD с закрытием поверхности тяжелой цепи, составляющей 715.3 Å² от общей суммы. Семь водородных связей и 4 солевых мостика взаимодействий образовались между VISTA и легкой цепью VSTB112, а 10 атомов водорода и 2 солевых мостика взаимодействий между VISTA и тяжелой цепью VSTB112. VSTB112 распознавало остатки в переднем слое нитей C', C, F, и G на концах, близких к FG петле, а также остатки в BC, FG, и CC' петлях (фиг. 29 и 30). Взаимодействия с CC' петлей приходились на большую часть контактов с легкой цепью Fab с только остатками E125 и R127 в FG петле делали дополнительные взаимодействия легкой цепи. Остатки 119 до 127, соответствующие FG петле VISTA приходились на 38% от общей 1034.8 Å² площади поверхности, закрывающиеся после связывания VSTB112. В частности, такая петля является высокополярной, включала в себя следующую последовательность-IRNNHSEHR- (SEQ ID NO: 76). Кроме того, W103 в VSTB112 CDR H3 хорошо наложены против остатков H122 и H123 остова VISTA, а H121 VISTA осуществляли боковые взаимодействия с ароматическим кольцом F55 в CDR H2.

Сравнение участков эпитопов по кристаллографии и HDX показано на фиг. 31.

Пример 15. Активация Т-клеток и моноцитов с помощью анти-VISTA антител.

Эффект функционального характера анти-VISTA антител оценивали в двух исследованиях *in vitro* assays, реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) и SEB (энтеротоксин В Staphylococcus). Оба исследования измеряли Т-клеточную пролиферацию и выработку цитокинов, в качестве их основных показателей, но такие эффекты были обусловлены различными механизмами. В MLR, мононуклеарах периферической крови (PBMCs) от двух различных человеческих доноров инкубировали вместе, а главный комплекс гистосовместимости (МНС) не соответствовал между Т-клетками одного донора и дендритными клетками другого донора, приводящий к Т-клеточной пролиферации и выработке интерферона (IFN γ). В исследовании SEB, PBMCs от одного донора инкубировали с бактериальным суперантигеном, который непосредственно связывал белок МНС Class II на поверхности антиген-презентирующих клеток (APC) с Т-клеточным рецептором (TCR) на Т-клетках, вызывая активацию Т-клеток, пролиферацию и выработку цитокинов. В обоих исследованиях, VSTB112, который представляет собой первичную молекулу VSTB174, показала дозозависимую индукцию Т-клеточной пролиферации и выработки цитокинов, и была самой активной среди кандидатов (фиг. 21А-21D, табл. 12).

Таблица 12

Значения EC₅₀ для исследований считывания MLR

Кандидат	EC ₅₀ пролиферация (мкг/мл)	EC ₅₀ IFN γ выработка (мкг/мл)
VSTB112	0.21	0.38
VSTB116	0.17	0.69
VSTB95	0.29	1.67
VSTB50	0.77	1.14
VSTB53	0.47	1.88
VSTB60	1.04	2.48

VSTB112 (первичная VSTB174) была самой активной молекулой.

Исследование активации моноцитов.

Данные исследования, показанные в табл. 12, были получены с VSTB112, первичной молекулой VSTB174. Для наилучшего понимания активности VSTB174 выполняли исследование активности моноцитов. Результаты показали, что инкубация VSTB174 с целыми PBMCs, вызывала повышенную экспрессию активационных маркеров (CD80 и HLA-DR) на CD14⁺ моноцитах, что указывало на эффект связывания антитела с субпопуляцией иммунных клеток, известными экспрессирующими высокие уровни VISTA (фиг. 32). Дополнительным вопросом является можно ли способствовать воздействию на активацию моноцитов в целых PBMC любым антителом, которое связывается с VISTA и имеет IgG1 Fc. Антитела VSTB103 и VSTB63 связывались с VISTA с высокой аффинностью (K_D 6.36E-10 и 8.30E-10 соответственно) и клетками, экспрессирующими белок VISTA, аналогично VSTB112 и VSTB111. VSTB103 находился в той же паре оснований эпитопа, как VSTB112, тогда как VSTB63 находился в другой паре оснований эпитопа; ни одно антитело не способствовало активации моноцитов. В целом, данные результаты показали, что один механизм, с помощью которого VSTB174 могли оказать свое влияние на активацию/пролиферацию Т-клеток, происходил посредством активации моноцитов, которой способствовали НК-клетки.

Приготовление среды 500 мл RPMI 1640 (Corning, 10-040-CV) смешивали с 50 мл человеческой сыворотки AB (Valley Biomedical, Inc, Lot #3C0405), 5 мл пенициллина/стрептомицина (Lonza, 17-602E) 10,000 ед./мл, 5 мл L-глутамин (100 \times) (Gibco, 25030-081) и 10 мл HEPES (1M) (Fisher BP299-100, Lot #-1). Среду хранили в течение не более чем 14 дней при 4 $^{\circ}$ C.

Приготовление раствора VISTA и контрольных антител.

Антитела разводили до 2 \times требуемой концентрации в 10% сывороточной среде AB: VSTB174: lot VSTB174.003.

Добавляли 100 мкл соответствующих растворов антител к соответствующим лункам 96-луночного планшета с U-образным дном (Falcon, 353077). Затем добавляли разные клеточные популяции в количестве 100 мкл, конечная концентрация каждого антитела составляла 1, 0.1 или 0.01 г/мл. CNTO 3930 контрольное антитело IgG1 (Lot 6405, ENDO <0.1 EU/mg) добавляли в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Выделение PBMCs.

Донорам было по меньшей мере 18 лет, как правило, здоровые и выбирались случайным образом из местного населения.

Донорскую кровь переносили из изолированной пробирки в 50 мл коническую.

15 мл Фиколл 1077 (SIGMA, 10771) помещали осторожно под кровь, чтобы не смешать. Это было на 25 мл крови.

Клетки центрифугировали при 1250g в течение 25 мин при комнатной температуре без торможения.

Лейкоциты выделяли при интерфазе Фиколла и сыворотки и клетки разводили в 40 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS).

Клетки центрифугировали при 453g (1500 об/мин) в течение 10 мин при 4 $^{\circ}$ C.

Клетки ресуспенировали в 50 мл HBSS и подсчитывали путем переноса 500 мкл в отдельную про-

бирку Эппендорфа.

Кроме того, набор Pan Monocyte isolation kit от Miltenyi применяли согласно инструкциям производителя (cat #130-096-537) для выделения CD14⁺ клеток путем негативной селекции в нескольких обрабатываемых группах.

Подготовка к культивированию *in vitro*.

Определяли соответствующее необходимое количество клеток для исследования, исходя из количества анализируемых образцов. Популяцию иммунокомпетентных клеток высевали в концентрации 2.0×10^5 клеток/лунка в 96-луночный планшет с U-образным дном. Для CD14 популяции, отобранной негативно, засеивали 0.5×10^5 клеток. Все условия осуществляли в трех экземплярах. Клетки центрифугировали, как описано выше и ресуспендировали при концентрации 2×10^6 /мл для популяции целых РВМС и 0.5×10^6 /мл для популяции CD14, отобранной негативно, в 10% сывороточной среде АВ и добавляли 100 мкл исследуемого антитела к соответствующей лунке, доводя общий объем в каждой лунке до 200 мкл. Клетки инкубировали в течение 1, 2, или 3 дней при 37°C и 5% CO₂.

Окрашивание антител и проточная цитометрия.

96-луночный планшет с U-образным дном центрифугировали в течение 5 мин при 453g и удаляли супернатант.

Клетки промывали с 200 мкл PBS и центрифугировали как в этапе 5.5.1.

Супернатант сбрасывали и ресуспендировали в 50 мкл PBS, включающей в себя следующие антитела.

CD14-APC (клон HCD14) 1:250 (Biolegend cat #325608).

HLA-DR-PE Cy7 (клон L243) 1:250 (Biolegend cat #307616).

CD80-PE (клон 2D10) 1:250 (Biolegend cat #305208).

Hu FcR ингибитор связывания (eBioscience cat #14-9161-73).

Инкубировали в течение 20 мин на льду в темноте.

Добавляли 150 мкл PBS и центрифугировали, как на этапе 5.5.1. Добавляли 150 мкл буфер PBS и анализировали с помощью FACS. Образцы проверяли на проточном цитометре Miltenyi MACSQuant с 10-параметрами и анализировали с применением FlowJo 9.7.5 на экспрессию HLA-DR и CD80 на CD14⁺ популяции. Среднее геометрическое значение интенсивности флюоресценции (MFI), статистическая величина, которая определяет среднее значение множества чисел, применяли в качестве определяющей статистики для сравнения лечений.

Статистический анализ.

Вся статистика проводилась в Prism GraphPad, версия 6. Парное сравнение между группами делали в каждую временную точку с применением One-Way ANOVA с поправкой на множественность Тьюки. Р-значения менее чем 0.05 для всех исследований и сравнений, считались значительными. Для всех графиков и таблиц * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001.

Пример 16. Активности ADCC и ADCP анти-VISTA антител.

VSTB174 имели Fc IgG1, которые могли обеспечивать активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и антителозависимого клеточноопосредованного фагоцитоза (ADCP). Были проведены оба типа исследований и показали, что VSTB174 может лизировать или фагоцитировать K562-VISTA клетки (фиг. 33-34), но не миеломную клеточную линию K562 первичных клеток (данные не показаны). Дополнительным механизмом активации VSTB174 для модулирования ингибирующего действия VISTA может быть лизис или поглощение клеток, экспрессирующих высокие уровни VISTA, таким образом, удаляя их из локальной микросреды.

Пример 17. Активация ADCP дополнительными анти-VISTA антител.

Анализ фагоцитоза *in vitro* применяли для изучения усиления макрофаг-опосредованного фагоцитоза клеток, эктопически экспрессирующих VISTA анти-человеческими VISTA mAbs (VSTB173 и VSTB174). Такие mAbs клонировали в различные Fc остовы (IgG1 WT (дикий тип), IgG1 PR (устойчивые к действию протеазы), и IgG2σ) и постулировались для возможности иметь различные активности относительно усиленного фагоцитоза. PR остовы IgG1 и IgG1 способны связываться с Fc-рецепторами и имели потенциал, чтобы вызвать ADCP, в то время как IgG2σ не связывались с Fc-рецепторами и не опосредовали ADCP.

Анти-VISTA антитела исследовали в анализе ADCP с K562 первичными и K562-VISTA клетками-мишенями. Как показано на фиг. 35 и 36, VSTB174, VSTB149, VSTB173 и VSTB145 усиливали hMac фагоцитоз K562-VISTA клеток. VISTA антитела VSTB140 или VSTB132, и IgG2σ Fc, которые не связывались с Fc-рецепторами, не усиливали фагоцитоз, как ожидалось. VISTA mAbs VSTB174 и VSTB173 с IgG1 Fc показывали наиболее сильный фагоцитоз, чем VSTB149 и VSTB145 с IgG1PR Fc (см. табл. 13 и 14 для значений EC₅₀).

Таблица 13

Значения EC₅₀ анти-человеческих VISTA mAb

Лечение	VSTB174	VSTB149	VSTB140
EC ₅₀	0.0782	0.1142	NA

Таблица 14

Значения EC_{50} анти-человеческих VISTA mAb

Лечение	VSTB173	VSTB145	VSTB132
EC_{50}	0.0146	0.1075	NA

VSTB174 и VSTB173 показывали слабое усиление фагоцитоза K562 первичных клеток при самой высокой концентрации (фиг. 35 и 36), которое могло быть из-за низкой экспрессии VISTA K562 клетками. Другие анти-VISTA антитела не усиливали фагоцитоз K562 клеток.

Негативные контрольные антитела были исследованы каждое в двух различных концентрациях в анализе фагоцитоза K562-VISTA, но не вызывали никакого фагоцитоза. Данные результаты указывали, что фагоцитоз, опосредованный анти-VISTA антителами, специфичен и связан с экспрессией антигена VISTA K562-VISTA клетками.

Пример 18. Активация ADCC дополнительными анти-VISTA антителами.

С целью изучения их способности индуцировать ADCC исследовали следующие три человеческих анти-VISTA антитела.

VSTB174(IgG1).

VSTB149(IgG1PR).

VSTB174.LF (IgG1 LF (низкий уровень фукозы)).

Каждое антитело исследовали в шести различных концентрациях в пределах одного планшета, в трех повторах в течение двух отдельных экспериментов для общего количества шести точек данных.

VSTB174, VSTB149, и VSTB174.LF каждое демонстрирует измеряемую ADCC активность при 10, 1, 0.1 и 0.01 мкг/мл, в то время как только LF антитело показывало измеряемую ADCC активность при 0.001 мкг/мл; ни одно из антител не показало ADCC при 0.0001 мкг/мл. Поскольку каждое из таких антител имели вариант Fc IgG1 или IgG1, данные результаты были, как и ожидалось. LF антитела показывало увеличенную активность ADCC о чем свидетельствовало меньшее значение EC_{50} для кривой LF антитела (0.002293 мкг/мл) по сравнению с обычной кривой IgG1 антитела (0.02381 мкг/мл). Кривая PR IgG1 антитела имела значение EC_{50} , аналогичное обычной кривой IgG1 (0.01846 мкг/мл).

Таблица 15

Значения EC_{50} (мкг/мл) трех исследований анти-VISTA антител, как определено с помощью анализа ADCC

анти-VISTA антитело	EC_{50} (мкг/мл)
VSTB174 (IgG1)	0.02381
VSTB149 (IgG1 PR)	0.01846
VSTB174.LF (IgG1 LF)	0.002293

Все человеческие IgG1, человеческие IgG1 PR и человеческие IgG1 LF показали измеряемую ADCC, опосредованную цитолизом при концентрации антител 10, 1, 0.1 и 0.01 мкг/мл, в то время как только LF антитела показали цитолиз при концентрации антител 0.001 мкг/мл. Ни одно анти-VISTA антитело не показало цитолиз при концентрации антител 0.0001 мкг/мл.

LF антитело показало приблизительно в 10 раз большую активность, ослабляющую ADCC, чем любое из регуляторных антител IgG1 или PR IgG1 антител, как показано в значениях EC_{50} .

Пример 19. Аффинность VSTB174 для VISTA человека и яванского макака.

Аффинность VSTB174 для внеклеточного домена (ECD) VISTA человека и яванского макака определяли с помощью способа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе ProteOn. VSTB174 отображали очень похожие значения K_D для каждого белка, 1.56E-10 M для человеческих ECD VISTA и 8.66E-11 M для VISTA яванского макака.

Пример 20. VISTA антитела, показывающие эффективность в мышинных моделях опухоли.

Мышиные штаммы, реагенты и модели опухоли.

Для исследований *in vivo* применяли человеческие VISTA нокин (VISTA-KI) мыши возвратно-скрещенной в фононовый C57B1/6.

Анти-человеческие VISTA антитела получали для того, чтобы исследования в VISTA-KI мышцах, используя вариабельный участок VSTB174, пересаженный в Fc IgG2a мыши (VSTB123).

MB49 рак мочевого пузыря оценивали в VISTA KI мышцах.

В дополнении к опубликованным исследованиям, показывающим, что терапия анти-VISTA антителами ингибировала рост опухоли у мышей дикого типа (Le Mercier et al., 2014), противоопухолевый эффект был показан в антителе-имитаторе хомячка у мышей дикого типа с применением различных режимов дозирования и у VISTA-KI мышей, получавших VSTB123.

Эффективность исследований *in vivo* в модели опухоли у MB49 VISTA-KI мышей.

Исследования эффективности MB49 проводили на VISTA-KI мышцах женского пола, исследовали VSTB123 в нескольких дозах, в пределах от 1-10 мг/кг. Мышам вводили внутривенно 250,000 клетки опухоли MB49 в день 0. На 6 день начинали дозирование, как показано на фиг. 37 (или 10 мг/кг изотипи-

ческого контроля mIgG2a, или указанные дозы VSTB123; 10 мышей/группа).

VSTB123 был более эффективен при высоких дозах по сравнению с низкими дозами, как показано на фиг. 37. Дозы 10 и 7.5 мг/кг были эквивалентными, тогда как опухоли увеличивались быстрее у мышей, которым вводили 5 или 1 мг/кг.

Пример 21. Определение экспрессии VISTA в человеческих опухолях с анти-VISTA антителами.

На фиг. 1 показана экспрессия VISTA с помощью AML опухолевой клеточной линии - это и данные экспрессии RNAseq в фиг. 17 поддерживали идею о том, что VISTA экспрессировался AML клетками и что лекарственное средство анти-VISTA было эффективно посредством прямого направленного взаимодействия этих клеток для иммунной модуляции или антителоопосредованного цитолиза.

Данные для оценки экспрессии VISTA в раке легких были получены от образцов рака легких хирургически удаленных. Клетки диссоциировали и характеризовали для экспрессии VISTA и многих других маркеров. Результаты показали, что 13/13 опухолей легких (плоские или аденокарциномы) включали в себя CD14⁺ VISTA⁺ миелоидные клетки (фиг. 38).

Пример 22. Определение экспрессии VISTA в опухолях легких с применением анти-VISTA антител.

Анализ иммуногистохимии был разработан с применением клона GG8, анти-человеческих VISTA IgG1 мыши. Такие mAb применяли для изучения окрашивания VISTA в немелкоклеточной карциноме легкого (NSCLC) FFPE участков опухоли. FFPE участки опухоли обрабатывали стандартными способами извлечения антигена до окрашивания. GG8 мышинные анти-человеческие VISTA антитела применяли в 1:500 разведении. GG8 связывание определяли с применением кроличьих анти-мышинных поликлональных антител, а затем HRP анти-кроличьим полимером. Последующее контрастирующее окрашивание с гематоксилином, затем оценивали участки опухоли.

Экспрессия VISTA в раке легких была главным образом ограничена иммунным инфильтратом (пример показан на фиг. 39) и высокие уровни VISTA положительных клеток присутствовали во многих образцах рака легких.

Пример 23. Структура внеклеточного домена (ECD) человеческих VISTA в комплексе с FАВ фрагментом VSTB174.

Варианты антигена VISTA получали и очищали для кристаллографии. Рекомбинантный his-меченный VSTB174 Fab был экспрессированным внутрь и очищенным. Кристаллы получали и применяли для сбора высокоразрешающих данных для комплекса VISTA ECD:VSTB174 Fab с применением магнитнотормозного излучения, а структурный анализ был разрешен с применением сочетаний гомологичного моделирования и анализа плотности электронов (фиг. 29 сверху). Структуру комплекса VISTA ECD:VSTB174 Fab определяли с помощью рентгеновской кристаллографии для разрешающей способности 1.85Å, обеспечивающей первичную структуру VISTA ECD и очерчивающей эпитоп и паратоп VSTB174. ECD VISTA принимал IgV петлю с топологией, аналогичной CTLA-4 ECD, но сохраняющей уникальную G' нить, которая протягивалась до переднего слоя Р-сэндвича. А' и G' дополнительно привязаны химически посредством дисульфидного мостика, образованного между остатками С12 в А' нити и С146 в G' нити. Шесть цистеинов обнаружены занятыми тремя внутримолекулярными дисульфидными связями, и, на основе кристаллических контактов, нет никаких доказательств для димерного VISTA. VSTB174 распознавал остатки в переднего слоя нитей C', C, F, и G на концах, ближайших к FG петле, а также остатки в BC, FG, и CC' петлях.

Учения во всех патентах, опубликованных заявках и рефератах, приведенных в настоящем изобретении, включены посредством ссылки в их полном объеме. Несмотря на то что настоящее изобретение было подробно показано и описано со ссылками на пример осуществления настоящего изобретения, это будет понятно специалистам в данной области техники, что различные изменения в форме и описания могут быть сделаны в пределах объема настоящего изобретения, включая прилагаемые пункты патентной формулы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или фрагмент такого антитела, включающий антигенсвязывающий участок, который связывается с V-доменом Ig супрессора Т-клеточной активации (VISTA), где антитело содержит

(a) гипервариабельные участки тяжелой цепи (CDRs), соответствующие SEQ ID NO: 25-27, и CDRs легкой цепи, соответствующие SEQ ID NO: 28-30; или

(b) CDRs тяжелой цепи, соответствующие SEQ ID NO: 19-21, и CDRs легкой цепи, соответствующие SEQ ID NO: 22-24.

2. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где фрагмент антитела представляет собой Fab, F(ab')₂ или scFv фрагмент антитела.

3. Антитело или фрагмент антитела по п.1, который включает константный участок человеческого антитела.

4. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-3, содержащее по меньшей мере одну тяжелую цепь человеческого антитела и по меньшей мере одну легкую цепь человеческого антитела.

5. Антитело или фрагмент антитела по п.4, где антитело содержит последовательности CDR, указанные в п.1(a), и содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, включающую последовательность варибельного участка тяжелой цепи SEQ ID NO: 37, или где антитело содержит последовательности CDR, указанные в п.1(b), и содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, включающую последовательность варибельного участка тяжелой цепи SEQ ID NO: 40.

6. Антитело или фрагмент антитела по п.4, где антитело содержит последовательности CDR, указанные в п.1(a), и содержит по меньшей мере одну легкую цепь, включающую последовательность варибельного участка легкой цепи SEQ ID NO: 44, или где антитело содержит последовательности CDR, указанные в п.1(b), и содержит по меньшей мере одну легкую цепь, включающую последовательность варибельного участка легкой цепи SEQ ID NO: 43.

7. Антитело или фрагмент антитела по п.4, где антитело содержит последовательности CDR, указанные в п.1(a), и содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, включающую последовательность варибельного участка тяжелой цепи SEQ ID NO: 37, и по меньшей мере одну легкую цепь, включающую последовательность варибельного участка легкой цепи SEQ ID NO: 44, или где антитело содержит последовательности CDR, указанные в п.1(b), и содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, включающую последовательность варибельного участка тяжелой цепи SEQ ID NO: 40, и по меньшей мере одну легкую цепь, включающую последовательность варибельного участка легкой цепи SEQ ID NO: 43.

8. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

9. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело представляет собой гуманизованное антитело.

10. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело связывается с эпитопом VISTA с K_D по меньшей мере 1×10^{-9} М.

11. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело связывается с эпитопом VISTA с K_D по меньшей мере 1×10^{-8} М.

12. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело связывается с эпитопом VISTA с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М.

13. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело или фрагмент антитела модулирует иммунный ответ, причем указанная модуляция включает увеличение $CD45^+$ лейкоцитов, увеличение $CD4^+$ Т-клеток, увеличение $CD8^+$ Т-клеток или их сочетание; или снижение VISTA-экспрессирующих иммунных клеток.

14. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-7, где антитело или фрагмент антитела модулирует иммунный ответ, причем указанная модуляция включает усиление выработки цитокинов, усиление Т-клеточного ответа и/или модуляцию экспрессии Foxp3.

15. Антитело или фрагмент такого антитела по п.1, в котором антитело или фрагмент антитела содержит последовательности CDR, указанные в п.1(a).

16. Антитело или фрагмент антитела по п.15, где VH домен антитела и VL домен антитела каждый включает один или несколько гуманизованных или человеческих каркасных участков.

17. Антитело или фрагмент антитела по п.16, в котором VH домен антитела включает SEQ ID NO: 37.

18. Антитело или фрагмент антитела по п.16 или 17, в котором VL домен антитела включает SEQ ID NO: 44.

19. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.15-18, в котором антитело включает константный участок тяжелой цепи антитела человека.

20. Антитело или фрагмент антитела по п.19, в котором человеческий константный участок тяжелой цепи представляет собой константный участок тяжелой цепи IgG1 человека.

21. Антитело или фрагмент антитела по п.20, в котором константный участок тяжелой цепи IgG1 включает аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи IgG1, присутствующую в SEQ ID NO: 61.

22. Антитело или фрагмент антитела по п.20, в котором константный участок тяжелой цепи IgG1 был модифицирован для усиления протеазной резистентности антитела.

23. Антитело или фрагмент антитела по п.22, в котором константный участок тяжелой цепи IgG1, который был модифицирован для усиления протеазной резистентности антитела, включает аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи IgG1, присутствующую в SEQ ID NO: 60.

24. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.19-23, в котором антитело включает константный участок легкой цепи антитела человека.

25. Антитело или фрагмент антитела по п.24, в котором константный участок легкой цепи антитела человека включает аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи, присутствующую в SEQ ID NO: 56.

26. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.15-25, в котором антитело включает тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56.

27. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.15-25, в котором антитело включает тяжелую

цепь, содержащую SEQ ID NO: 61, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56.

28. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп.15-27, где антитело или фрагмент антитела экспрессируется в клетке с дефицитом фукозилирования ферментов.

29. Антитело или фрагмент антитела по п.28, где клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

30. Композиция для лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающая антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель, растворитель или наполнитель.

31. Композиция по п.30, дополнительно включающая вакцину, выбранную из вакцины на основе вирусного вектора, бактериальной вакцины, ДНК вакцины, РНК вакцины, пептидной вакцины или белковой вакцины.

32. Композиция для лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающая антитело или фрагмент антитела по любому из пп.15-29 и фармацевтически приемлемый носитель, растворитель или наполнитель.

33. Выделенная нуклеиновая кислота, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела по п.1.

34. Экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п.33, функционально связанную с промотором.

35. Клетка-хозяин, трансформированная экспрессионным вектором по п.34 для получения антитела или фрагмента антитела по п.1.

36. Способ получения антитела или фрагмента антитела по п.1, где способ включает культивирование клеток-хозяев по п.35 и выделение указанного антитела или фрагмента антитела.

37. Набор для лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий композицию по любому из пп.30-32 и контейнер и дополнительно содержащий инструкцию по применению или этикетку, указывающую, что композицию можно применять для лечения рака.

38. Способ лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный рак ассоциирован с повышенным уровнем экспрессии VISTA и/или VTSTA-экспрессирующими иммунными клетками, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-14.

39. Способ лечения или предотвращения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный рак ассоциирован с повышенным уровнем экспрессии VISTA и/или VISTA-экспрессирующими иммунными клетками, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции по п.30 или 31.

40. Способ по п.38 или 39, где индивидуум представляет собой млекопитающее.

41. Способ по п.38 или 39, где индивидуум представляет собой человека.

42. Способ по п.41, дополнительно включающий введение вакцины, выбранной из вакцины на основе вирусного вектора, бактериальной вакцины, ДНК вакцины, РНК вакцины, пептидной вакцины или белковой вакцины.

43. Способ по п.38 или 39, где рак представляет собой рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, лейкоз, лимфому, миелодиспластический синдром или миелому либо их сочетание.

44. Способ по п.43, где рак легких представляет собой немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC).

45. Способ по п.38 или 39, где рак представляет собой лейкоз, лимфому, миелодиспластический синдром или миелому либо их сочетание.

46. Способ по п.45, где лейкоз представляет собой лимфоцитарный лейкоз или миелогенный лейкоз.

47. Способ по п.45, где лейкоз представляет острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелоидный (миелогенный) лейкоз (AML), хронический гранулоцитный лейкоз (CMML), лейкоз ворсистых клеток, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лейкоз из больших зернистых лимфоцитов или Т-клеточный лейкоз взрослых.

48. Способ по п.47, где рак представляет собой острый миелоидный (миелогенный) лейкоз (AML).

49. Способ по п.47, где рак представляет собой хронический гранулоцитный лейкоз (CMML).

50. Способ по п.38 или 39, где рак представляет собой плотную опухоль.

51. Способ по п.50, где плотная опухоль окружена стромой опухоли, содержащей миелоидные клетки, Т-клетки или сочетание миелоидных клеток и Т-клеток.

52. Способ по п.50 или 51, где плотная опухоль инфильтрирована миелоидными клетками, Т-клетками или сочетанием миелоидных клеток и Т-клеток.

53. Способ подавления роста опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества антитела или фрагмента антитела по пп.1-29 или композиции, содержащей указанное антитело или фрагмент антитела, субъекту, нуждающемуся в этом.

54. Способ по любому из пп.38-53, где композицию, антитело или фрагмент антитела вводят парентерально или непарентерально.

55. Способ по п.54, где композицию, антитело или фрагмент антитела вводят внутривенно, подкожно или перорально.

56. Способ по любому из пп.38-53, где доза вводимой композиции, антитела или фрагмента антитела составляет 0.1-15 мг/кг на одно введение.

57. Способ по любому из пп.38-53, где композицию, антитело или фрагмент антитела вводят еженедельно, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в три месяца.

58. Способ по любому из пп.38-53, дополнительно включающий проведение второй противоопухолевой терапии, представляющей собой оперативное вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, биологическую терапию или иммуномодулирующую терапию либо их сочетание.

59. Способ лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп.15-29 либо композиции по п.32.

60. Способ по п.59, где рак представляет собой рак легких.

61. Способ по п.59, где рак представляет собой рак мочевого пузыря.

62. Способ по п.59, где рак представляет собой рак молочной железы.

63. Способ по любому из пп.59-62, дополнительно включающий проведение второй противоопухолевой терапии, где вторая противоопухолевая терапия представляет собой оперативное вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, биологическую терапию или иммуномодулирующую терапию либо их сочетание.

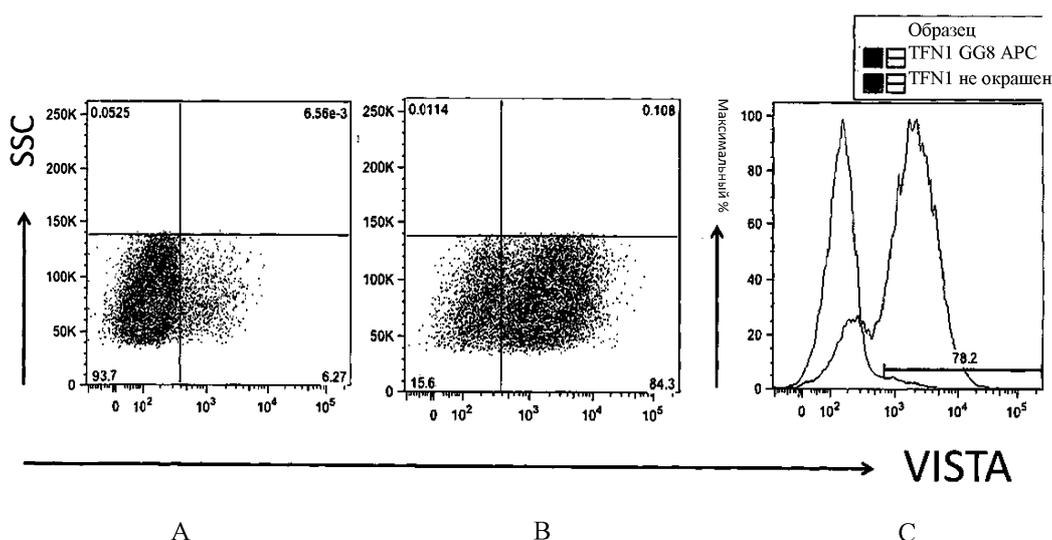
64. Способ лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп.15-29 либо композиции по п.32.

65. Способ усиления иммунного ответа у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента антитела по пп.1-29, тем самым усиливая иммунный ответ.

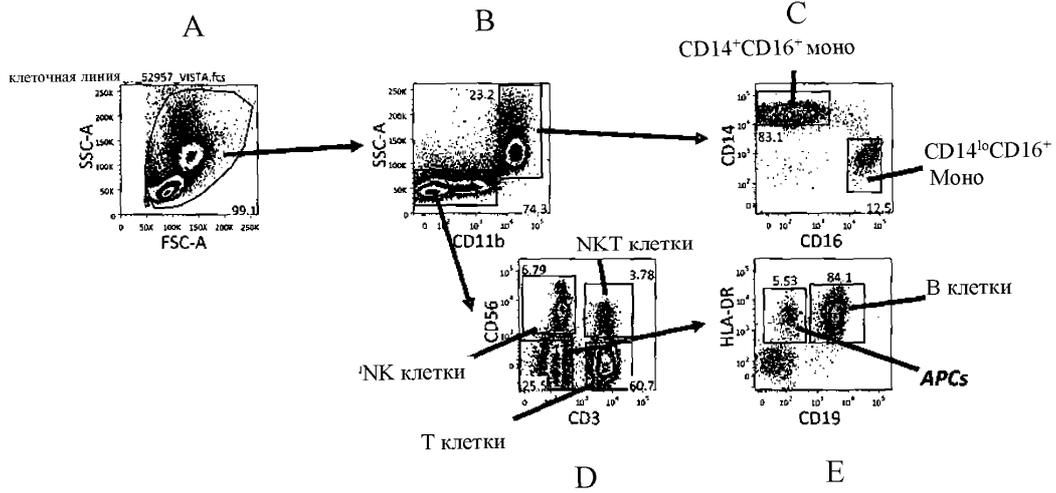
66. Способ по п.65, где иммунный ответ представляет собой противоопухолевый иммунный ответ.

67. Способ, вызывающий биологический ответ у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента антитела по пп.1-29, тем самым усиливая иммунный ответ на рак, где биологический ответ выбран из группы, состоящей из

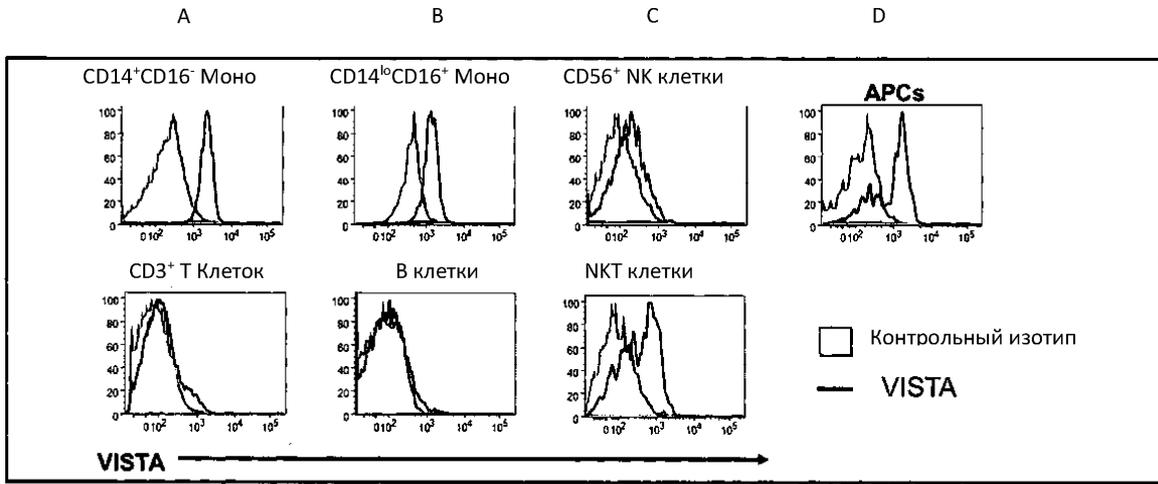
- a) активации моноцитов;
- b) индукции пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов;
- c) увеличения выживаемости моноцитов;
- d) индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) в клетках, экспрессирующих VISTA; и
- e) индукции антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) в клетках, экспрессирующих VISTA.



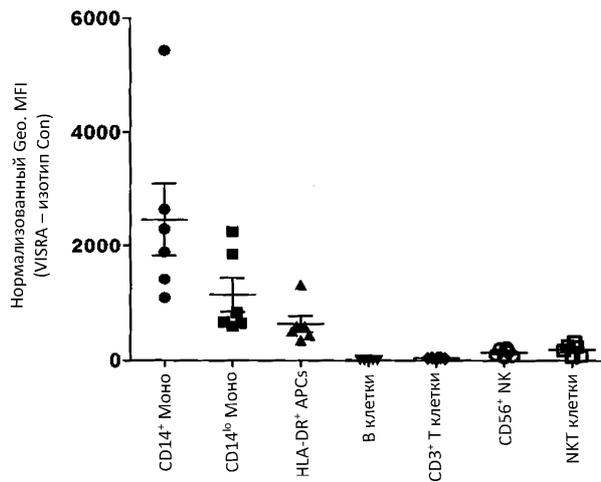
Фиг. 1



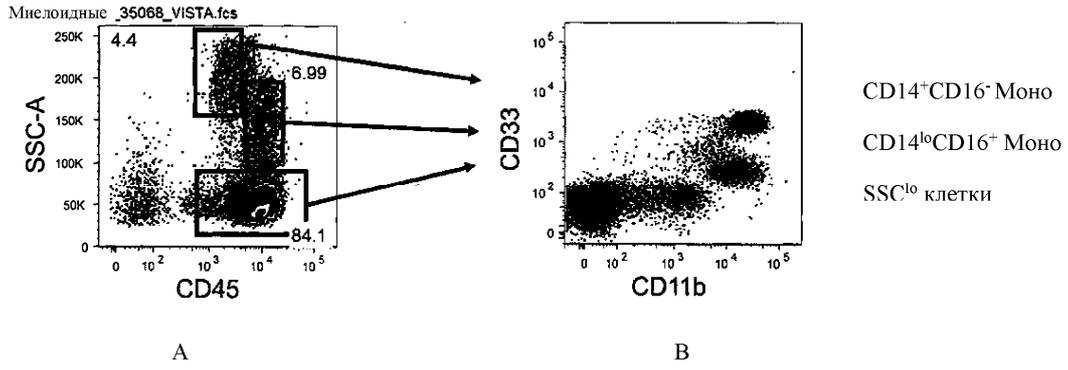
Фиг. 2



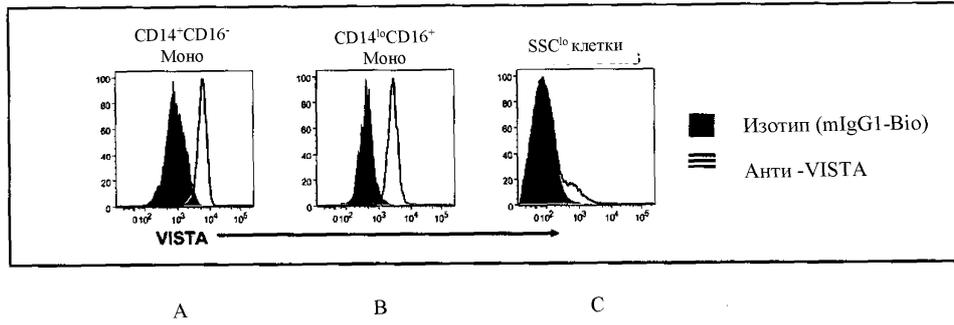
Фиг. 3



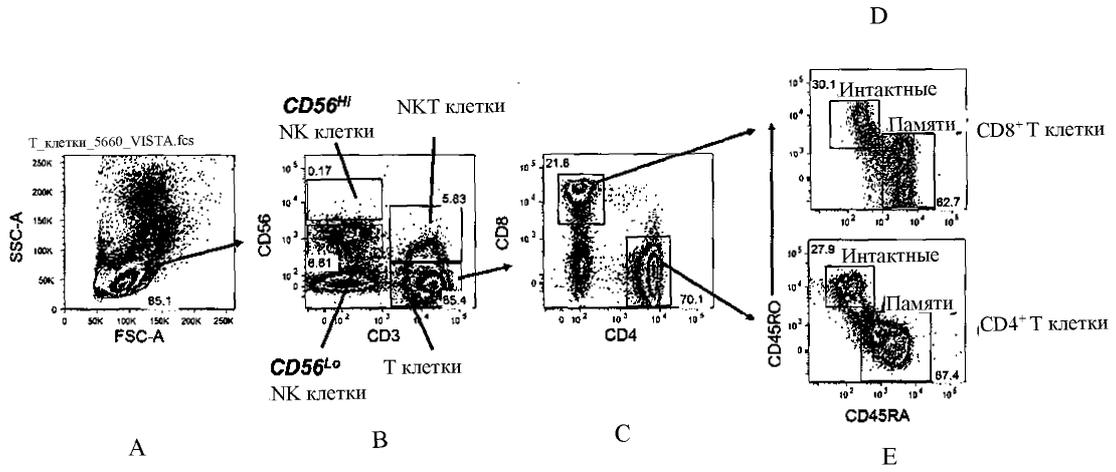
Фиг. 4



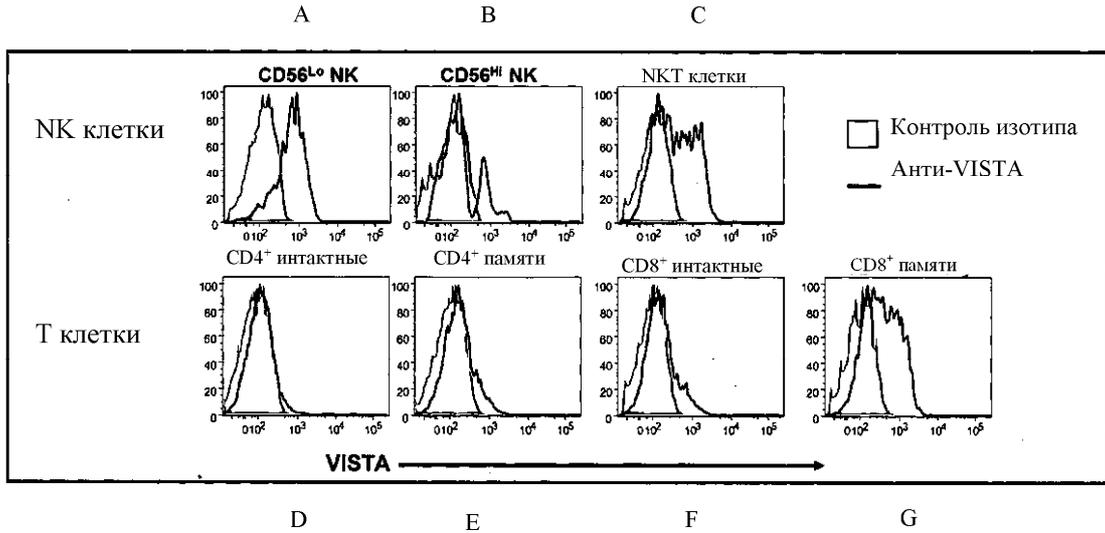
Фиг. 5



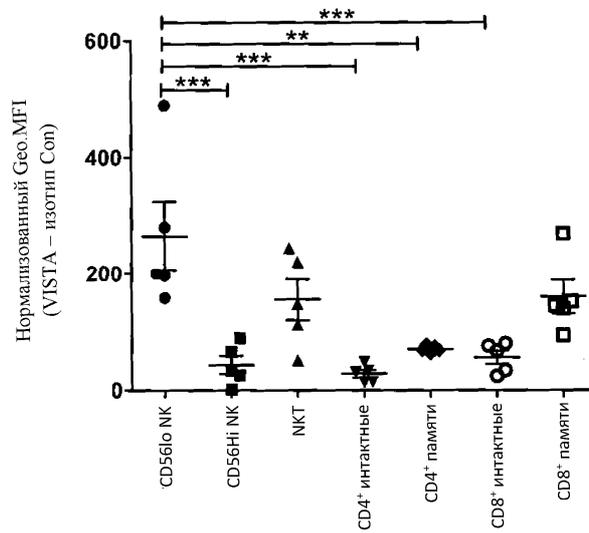
Фиг. 6



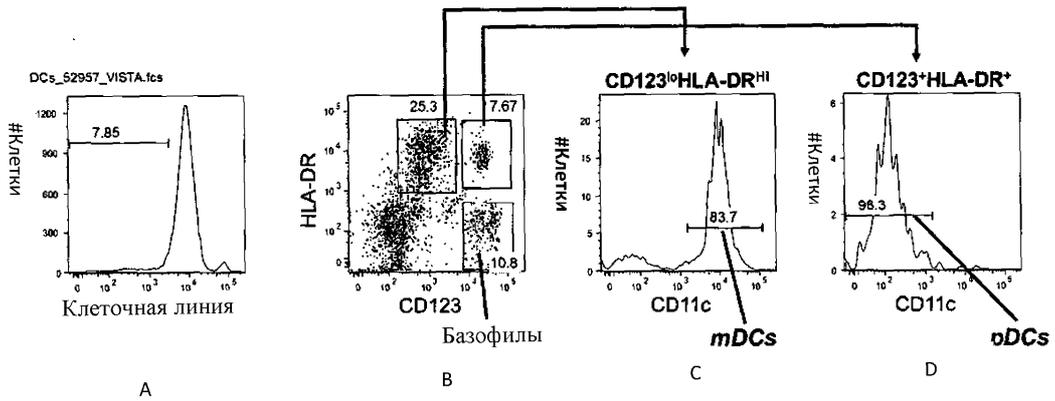
Фиг. 7



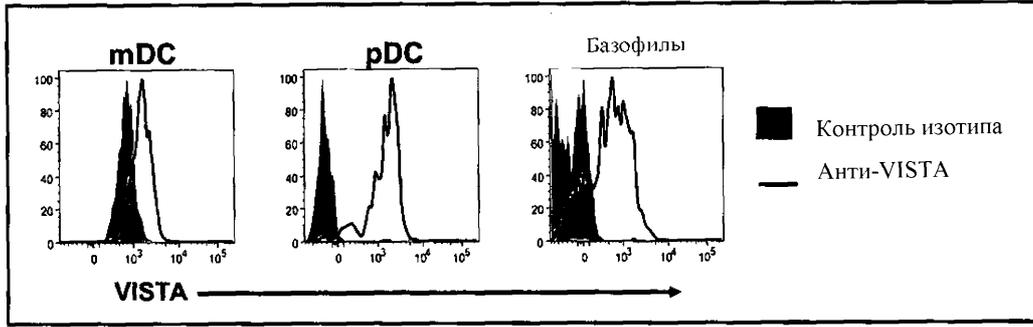
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

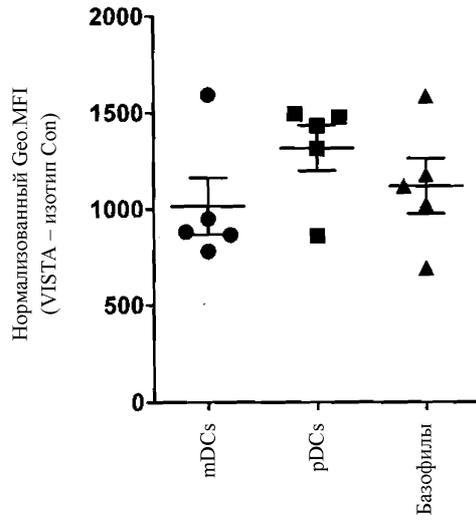


A

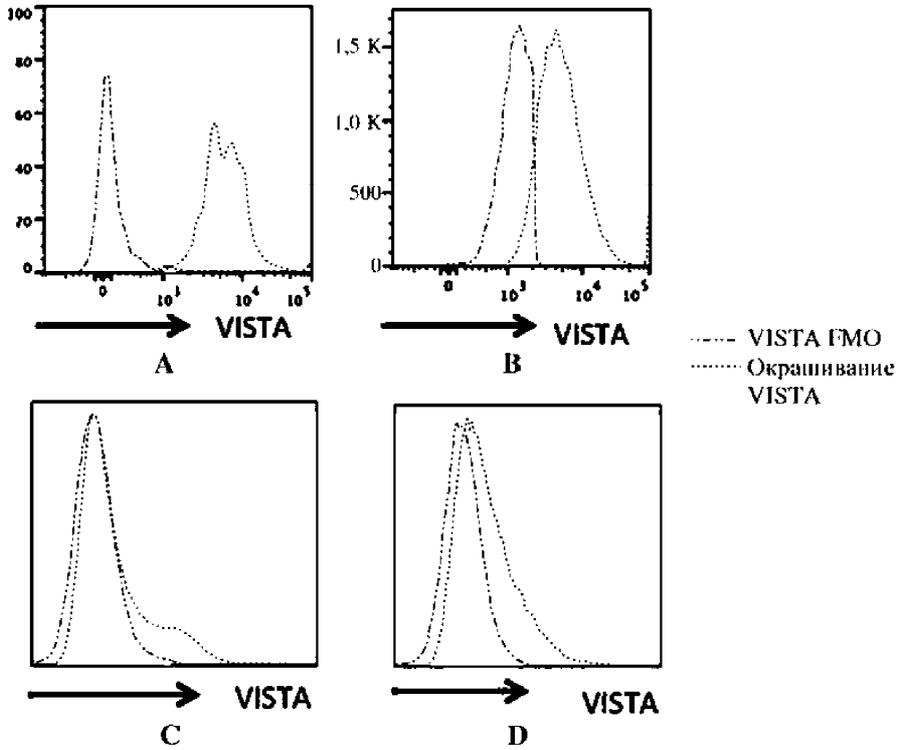
B

C

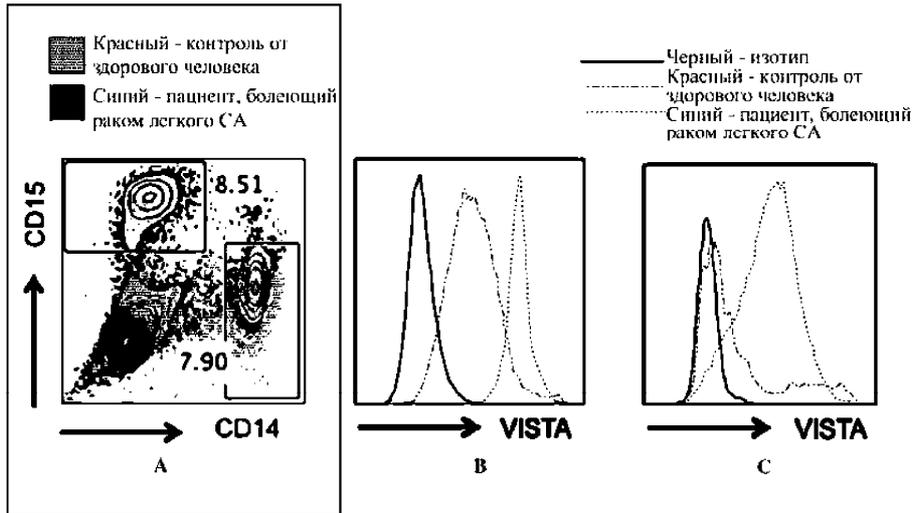
Фиг. 11



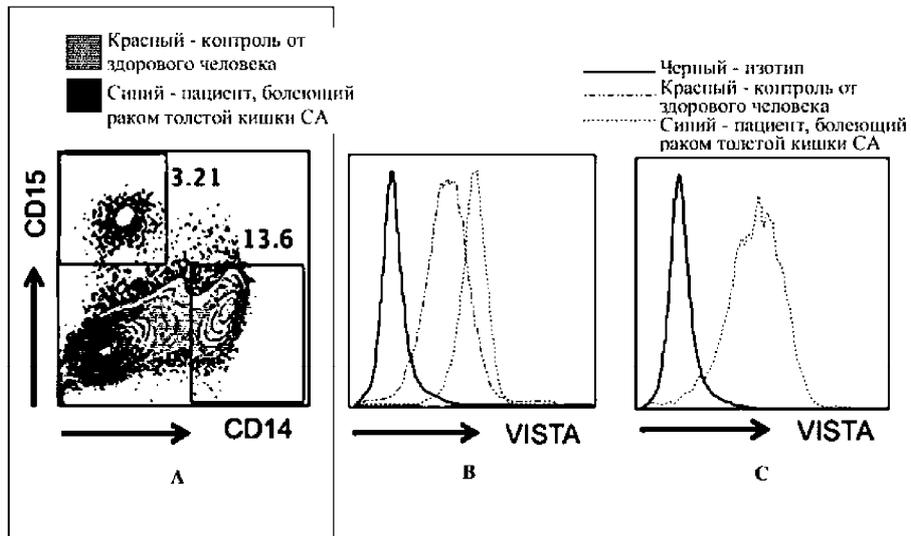
Фиг. 12



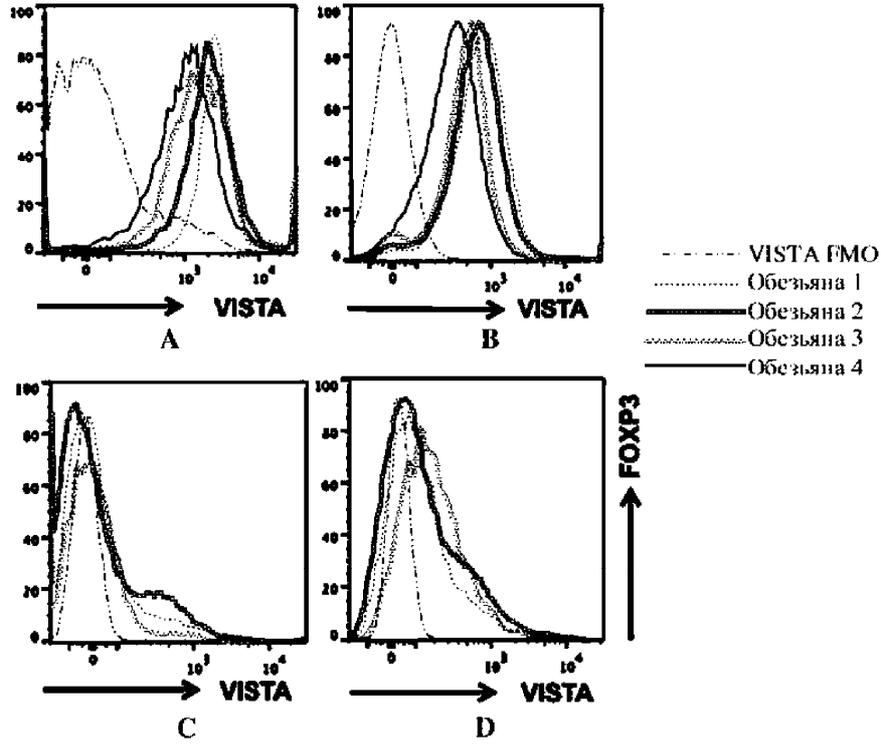
Фиг. 13



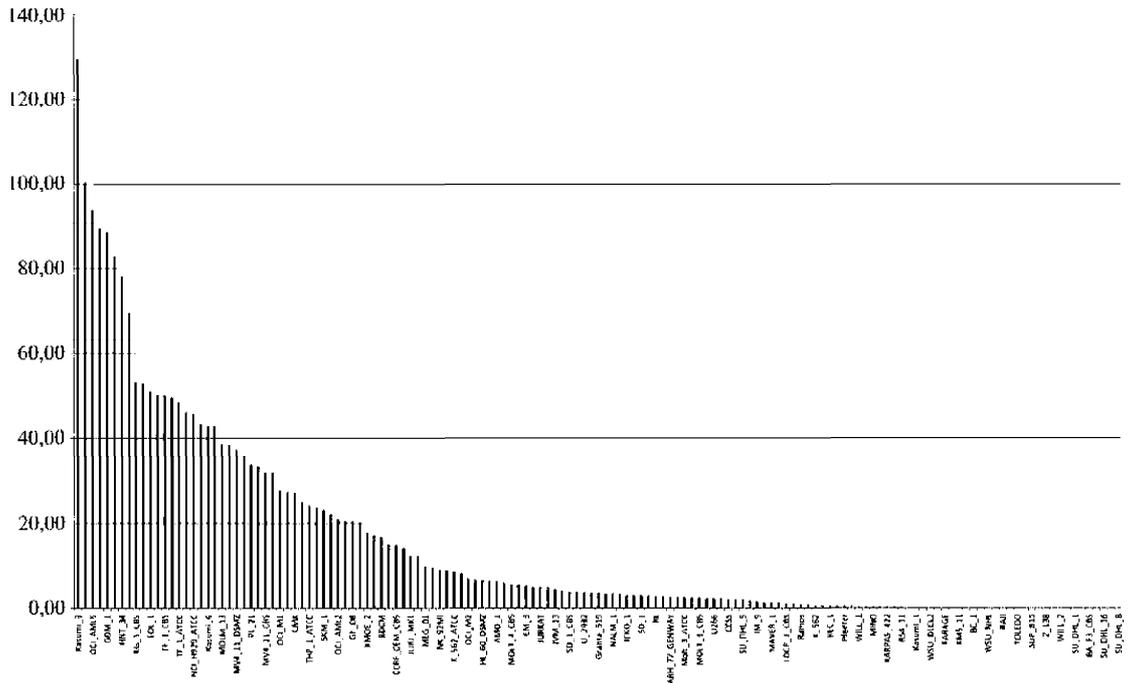
Фиг. 14



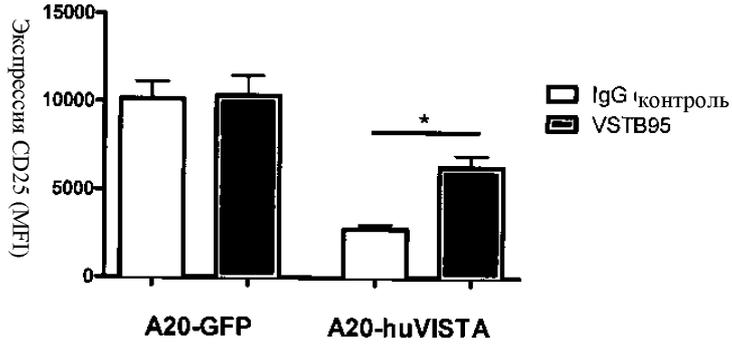
Фиг. 15



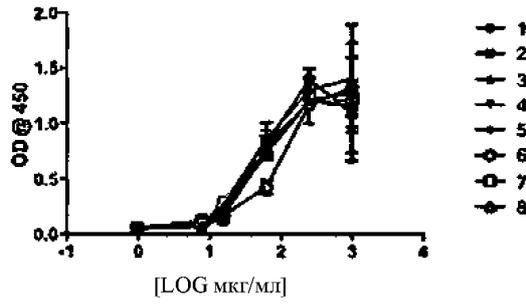
Фиг. 16



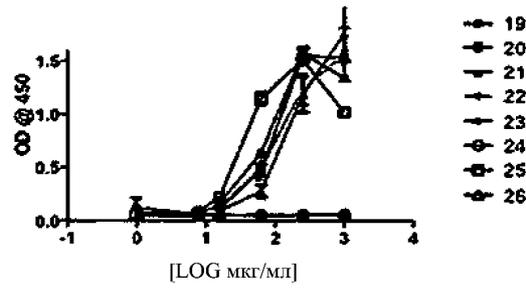
Фиг. 17



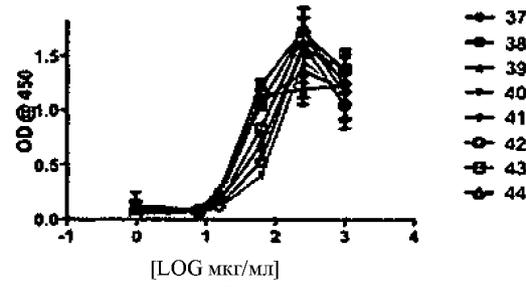
Фиг. 18



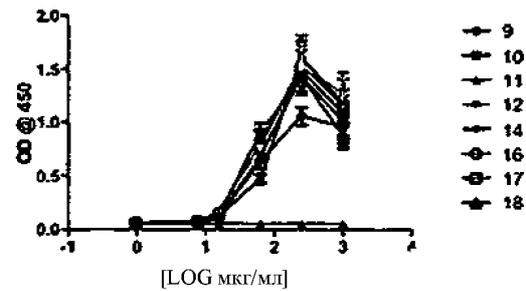
Фиг. 19А



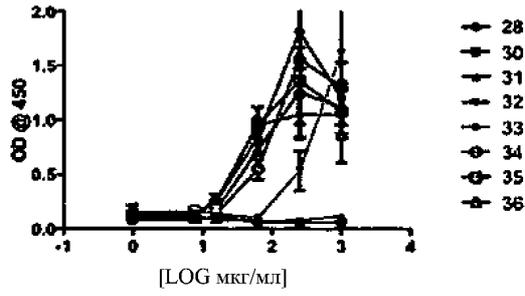
Фиг. 19В



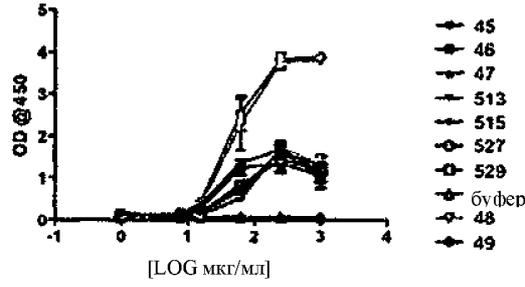
Фиг. 19С



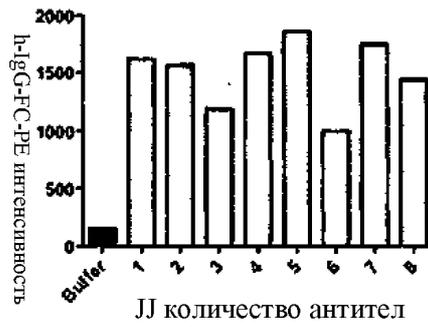
Фиг. 19D



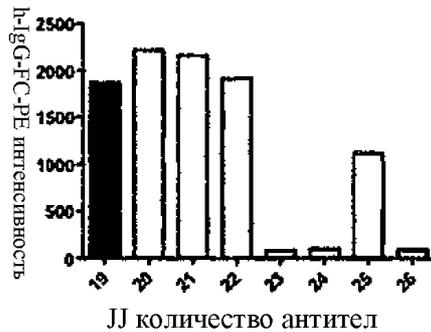
Фиг. 19Е



Фиг. 19F



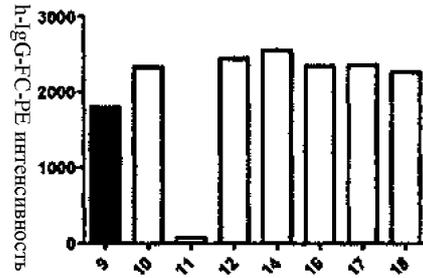
Фиг. 20А



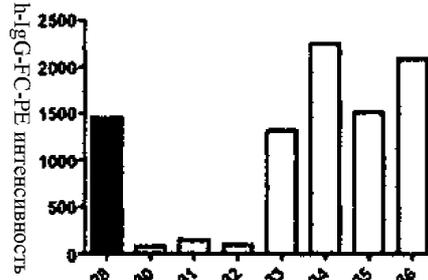
Фиг. 20В



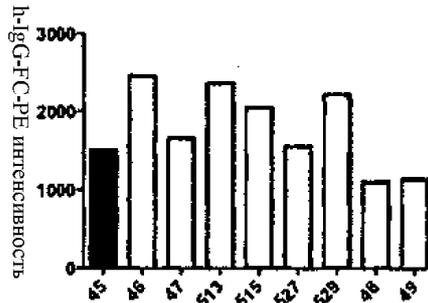
Фиг. 20С



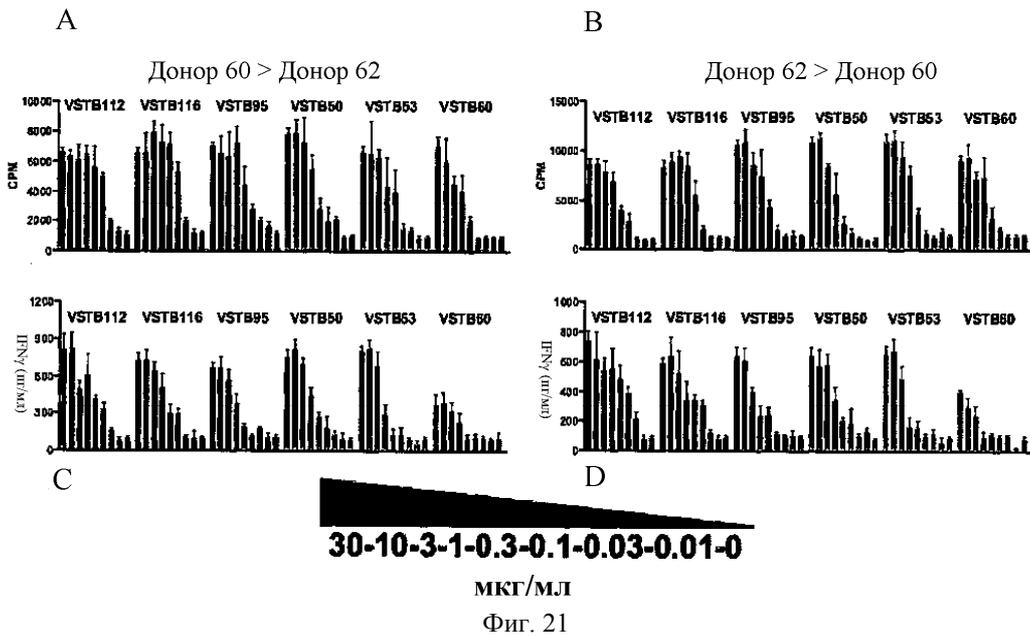
JJ количество антител
Фиг. 20D



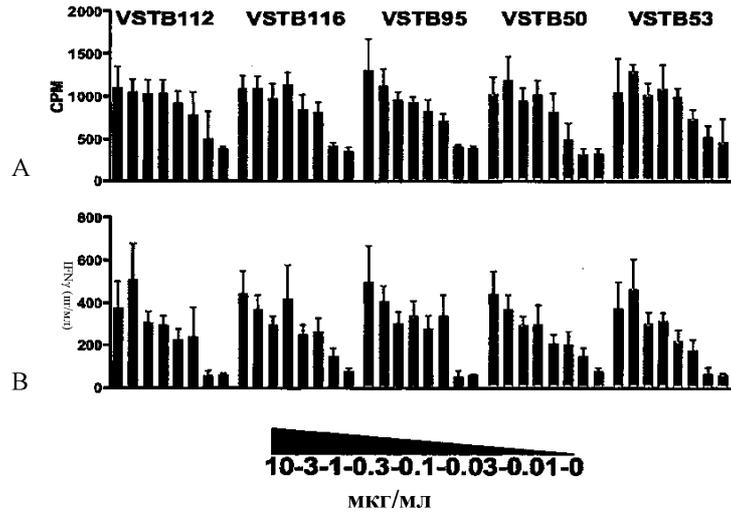
JJ количество антител
Фиг. 20E



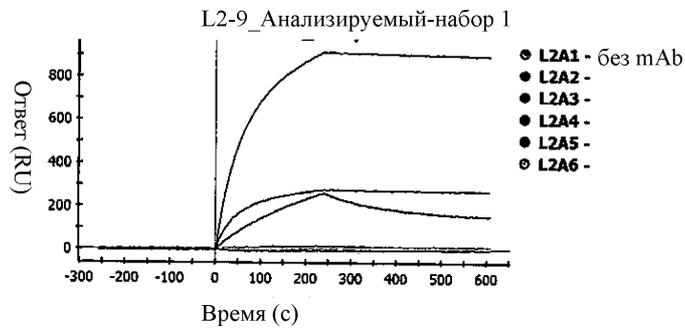
JJ количество антител
Фиг. 20F



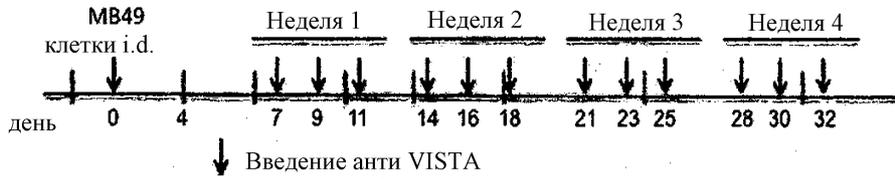
Донор #1



Фиг. 22



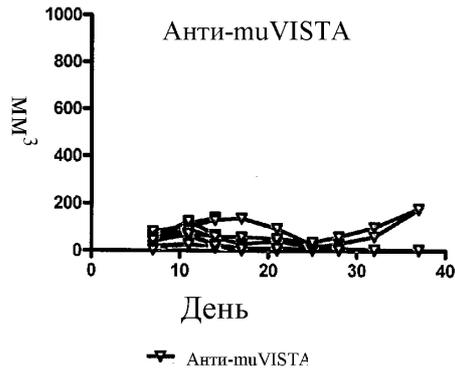
Фиг. 23



Фиг. 24



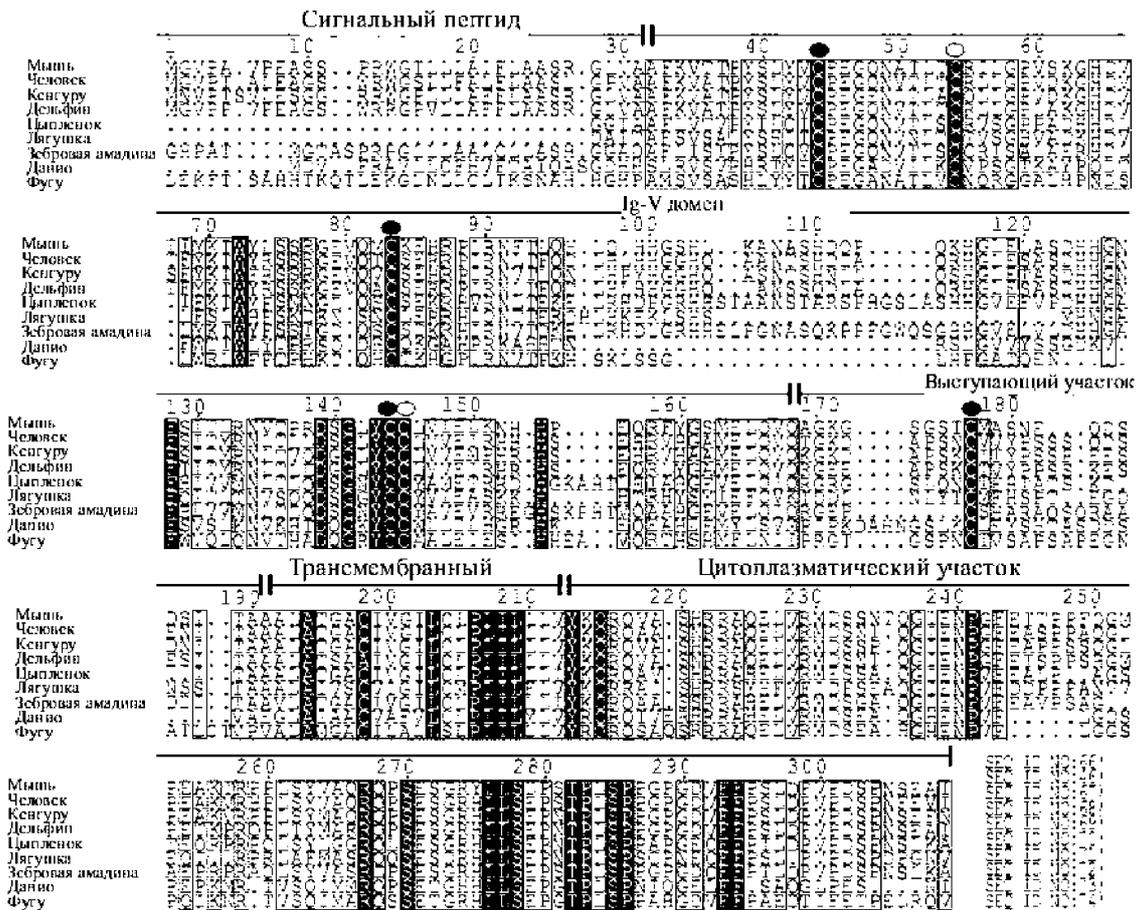
Фиг. 25А



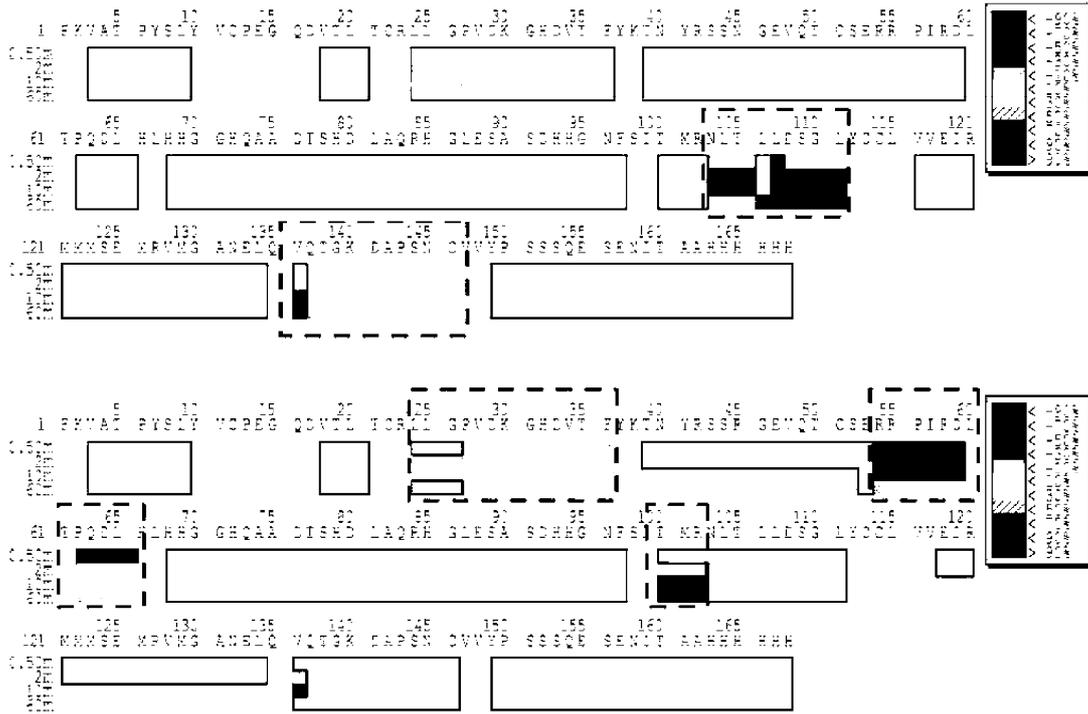
Фиг. 25В

MGVPTALEAGSWRWGSLFLALFLAASLGPVAAFKVATPYSLYVCP
 EGQNVTLTCRLLGPVDKGDHVTFYKTYWRSSRGEVQTCSERRPI
 RNLTFFQDLHLHHGGHQAAANTSHDLAQRHGLASADHHGNFSIT
 MRNLTLDSGLYCVLVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPS
 NCVVYPSSSQESENITAAALATGACIVGILCLPLILLVYKQ
 RQAASNRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHP
 LSYVAQRQPESGRHLLSEPSTPLSPGPGDVF (SEQ ID NO:46)

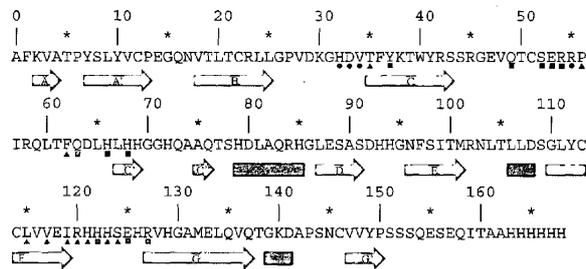
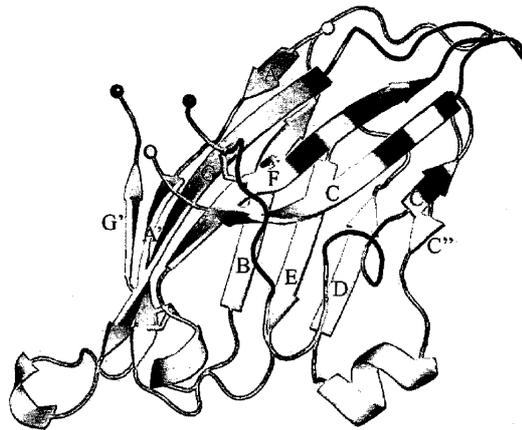
Фиг. 26



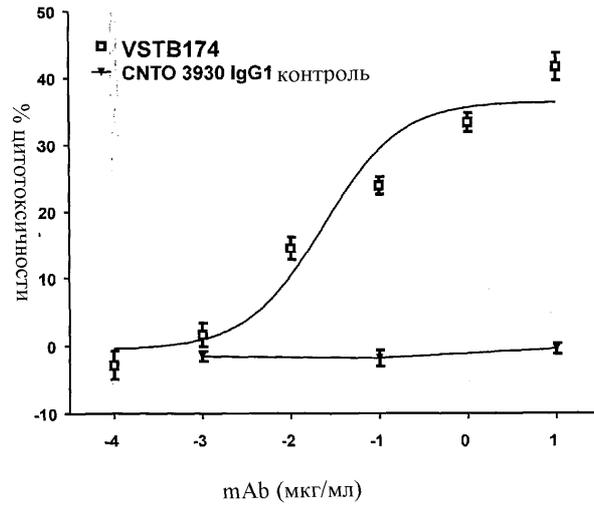
Фиг. 27



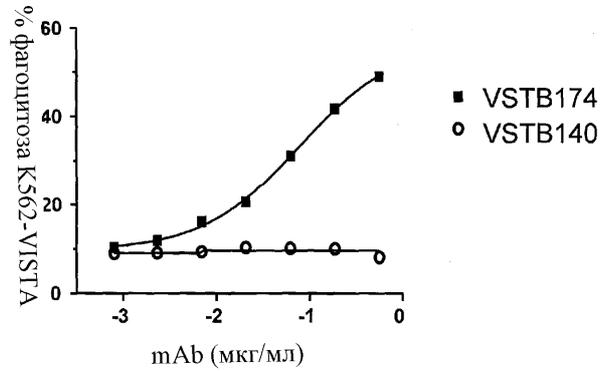
Фиг. 28



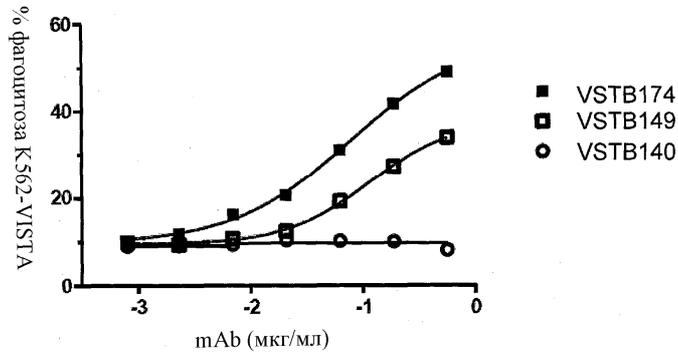
Фиг. 29



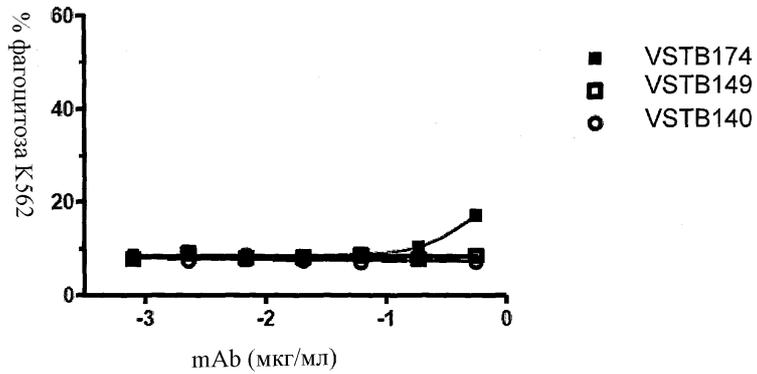
Фиг. 33



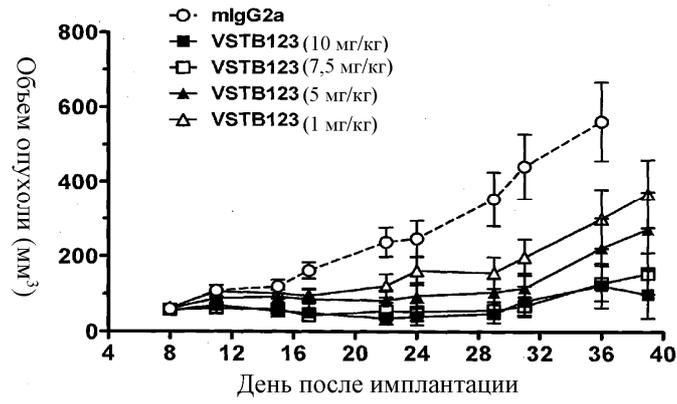
Фиг. 34



Фиг. 35

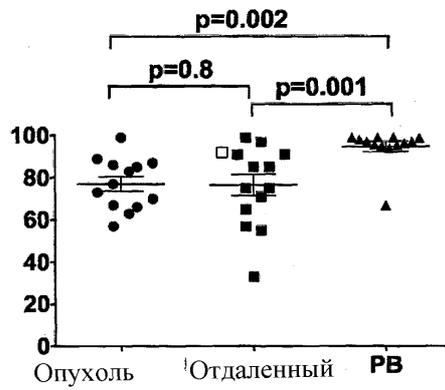


Фиг. 36

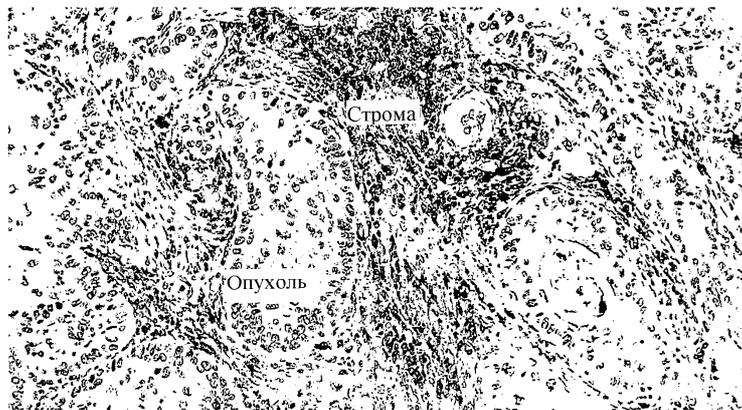


Фиг. 37

CD14⁺VISTA^{hi/int}



Фиг. 38



Фиг. 39