

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290786** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.12.19

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.27

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ PD-1 ОСИ И АНТИТЕЛ К ПЕРИОСТИНУ**

(86) PCT/CA2020/051164

(74) Представитель:

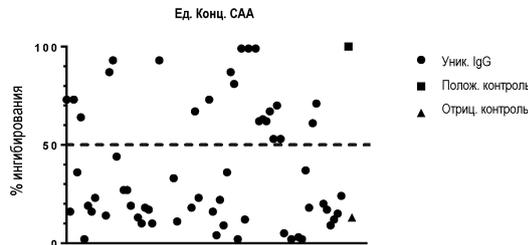
(87) WO 2021/046634 2021.03.18

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ИО
КАНАДА, ИНК. (CA)**

(72) Изобретатель:
**Джетха Ариф, Франссон Юхан,
Макгрей ЭйДжей Роберт, Хьюм
Джоанн (US)**

(57) В изобретении описаны способы лечения злокачественного новообразования, включающие введение особи (а) ингибитора PD-1 оси и (б) ингибитора периостина.



A1

202290786

202290786

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ PD-1 ОСИ И АНТИТЕЛ К ПЕРИОСТИНУ

5

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0000] Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в ASCII формате и, следовательно, полностью включен посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 11 августа 2020 г., называется 01-3435-WO-1_SL.txt и имеет размер 19155 байт.

10

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Периостин представляет собой белок внеклеточного матрикса, который предположительно регулирует различные физиологические процессы, включая эпителиально-мезенхимальный переход, взаимодействие клетки с матриксом и воспаление. Было показано, что его экспрессия нарушена при некоторых патологиях, включая злокачественное новообразование и фиброз, где экспрессия периостина коррелирует с отрицательным исходом. Дополнительно к регуляции внеклеточного ремоделирования путем связывания с другими белками внеклеточного матрикса, такими как фибронектин и коллаген, было показано, что опосредуемая периостином передача сигналов интегрином является критически важной как для миграции злокачественных клеток, так и для захвата иммунных клеток в онкогенных условиях.

15

20

25

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] В настоящей заявке описаны способы, применения и комбинации ингибиторов PD-1 оси и ингибиторов периостина для лечения злокачественного новообразования. Способы, описанные в настоящей заявке, снижают содержание коллагена в опухолях, уменьшают инфильтрацию популяций супрессивных миелоидных клеток, таких как гранулоциты и опухоль-ассоциированные макрофаги, при этом увеличивая поляризацию макрофагов на M1 фенотип, и увеличивая противоопухолевые свойства Т-клеток, инфильтрирующих опухоль.

30

[0003] В одном аспекте, в настоящей заявке описан способ лечения особи, которая имеет злокачественное новообразование, который включает введение

особи (а) ингибитора PD-1 оси; и (б) ингибитора периостина. В определенных вариантах осуществления, ингибитор периостина включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином. В определенных вариантах осуществления, ингибитор периостина включает

5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, содержит: (а) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (б) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-

10 H2), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT), или 6 (ISAYDGNT); (в) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY), или 9 (DMLVVPFDY); (г) легкую

15 цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (д) легкую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-L2) аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 11 (SND); и (е) легкую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-L3), содержащую аминокислотную

20 последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, является химерным или гуманизированным. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий

25 фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой IgG антитело. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В определенных вариантах осуществления,

30 рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, включает тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина: (а) где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в

SEQ ID NO: 13; и (б) где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под номером 55 в SEQ ID NO: 13 представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостинном, имеет IC50 меньше чем приблизительно 50 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1.

[0004] Ингибитор PD-1 пути в контексте настоящего изобретения и всех его вариантов осуществления представляет собой соединение, которое ингибирует взаимодействие PD-1 с его рецептором (ами). Ингибитор PD-1 пути способен препятствовать PD-1 пути передачи сигналов, предпочтительно опосредуемым PD-1 рецептором. PD-1 ингибитор может представлять собой любой ингибитор, направленный против любого представителя PD-1 пути, способный антагонизировать PD-1 путь передачи сигналов. Ингибитор может представлять собой антагонистическое антитело, нацеленное на любой представитель PD-1 пути, предпочтительно направленный на PD-1 рецептор, PD-L1 или PD-L2. Также, ингибитор PD-1 пути может представлять собой фрагмент PD-1 рецептора или PD-1 рецептор, блокирующий активность PD1 лигандов.

[0005] PD-1 антагонисты хорошо известны в данной области техники, например, в обзоре Li и др., *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1151 (включенном в настоящую заявку в качестве ссылки). Любой PD-1 антагонист, в особенности антитела, такие как те, которые описаны Li и др., а также другие антитела, описанные далее в настоящей заявке, могут использоваться в соответствии с изобретением. Предпочтительно, PD-1 антагонист согласно настоящему изобретению и всех его вариантов осуществления выбирают из группы, включающей следующие антитела: пембролизумаб (анти-PD-1 антитело);

ниволумаб (анти-PD-1 антитело); пидилизумаб (анти-PD-1 антитело); тислелизумаб (анти PD-1); спартализумаб (PDR-001) (анти-PD-1 антитело);, предпочтительно эзабенлимаб (анти-PD-1 антитело).

[0006] В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2. В определенных неограничивающих вариантах осуществления, антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2, включает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), BMS-936559 (MDX-1105), торипалимаб (JS001-PD-1), цемиплимаб (REGN2810), камрелизумаб (SHR-1210), достарлимаб (TSR-042) цетрелимаб (JNJ-63723283), или FAZ053, или его PD-1 или PDL-2 связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает Fc-слитый белок, который связывается с PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления, Fc-слитый белок включает AMP-224 или его PD-1 связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор пути передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 включает один или несколько: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил}метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серин гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1h-индол; L-α-Глутамин, N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; Глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-

L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический (1→14)-тиоэфир; или его производное или аналог.

[0007] В определенных вариантах осуществления, у особи развилось прогрессирующее заболевание после лечения с применением ингибитора контрольных точек в качестве монотерапии. В определенных вариантах осуществления, ингибитор контрольных точек включает ингибитор PD-1 доступа. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси и ингибитор периостина вводятся отдельно. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси и ингибитор периостина вводятся в тот же день. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси и ингибитор периостина вводятся в различные дни. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.

[0008] В другом аспекте, в настоящей заявке раскрыто антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, для применения у пациента, также подвергаемого лечению ингибитором PD-1 оси. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, содержит: (а) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (б) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT), или 6 (ISAYDGNT); (в) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY), или 9 (DMLVVPFDY); (г) легкую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (д) легкую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-L2) амино, содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 11 (SND); и (е) легкую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV).

[0009] В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, является химерным или гуманизированным. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий

5 фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой IgG антитело. В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный

10 переменный фрагмент (scFv). В определенных вариантах осуществления, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, включает тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина: (а) где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит

15 аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13; и (б) где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную

20 последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под номером 55 в SEQ ID NO: 13 представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где

25 метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин. В определенных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, имеет IC₅₀ меньше чем приблизительно 50 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками

30 фибробластов мышей. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1. В определенных вариантах осуществления, антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1, содержит Пембролизумаб, Ниволумаб, АМР-514, Тислелизумаб, Спартализумаб, предпочтительно эзабенлимаб, или его PD-1 связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или

PDL-2. В определенных вариантах осуществления, антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2, включает дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (MPDL3280A), авелумаб (MSB0010718C), BMS-936559 (MDX-1105), AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), цемиплимаб (REGN2810), торипалимаб (JS001-PD-1), камрелизумаб (SHR-1210), достарлимаб (TSR-042), цетрелимаб (JNJ-63723283), или FAZ053, или его PD-1 или PDL-2 связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает Fc-слитый белок, который связывается с PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления, Fc-слитый белок включает AMP-224 или его PD-1 связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор пути передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 включает один или несколько: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серин гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1h-индол; L-α-Глутамин, N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; Глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический (1→14)-тиоэфир; или его производное или аналог. В определенных вариантах осуществления, особь имеет злокачественное новообразование. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого

пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

- 5 [0010] Новые характерные признаки, описанные в настоящей заявке, подробно изложены в приложенной формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ, описанных в настоящей заявке, будет получено путем обращения к следующему подробному описанию, в котором излагаются иллюстративные примеры, в которых используются принципы описанных в
- 10 настоящей заявке признаков, и прилагаемым чертежам, на которых:
- [0011] **Фиг. 1** иллюстрирует ингибирование опосредованного периостинном прикрепления клеток с помощью 78 IgG с уникальной последовательностью, тестированных при единичной концентрации 500 нМ.
- [0012] **Фиг. 2** иллюстрирует рост опухоли на мышинной модели MB49 рака мочевого пузыря после лечения с применением NB0828 или контрольного
- 15 наполнителя.
- [0013] **Фиг. 3** иллюстрирует влияние лечения с применением NB0828 на накопление внутриопухолевых миелоидных клеток. Мыши, несущие MB49 опухоль, лечили с применением NB0828 или наполнителя, как описано на **Фиг. 2**.
- 20 Данные представлены в виде процентов общего CD45+ иммунного инфильтрата.
- [0014] **Фиг. 4** иллюстрирует изменения общего содержания коллагена в опухоли после лечения с применением NB0828. Мышей, несущих MB49 опухоль, лечили, как описано на **Фиг. 2**, и оценивали общее содержание коллагена в опухоли в конечных точках MB49 опухолей, как описано на способах.
- 25 [0015] **Фиг. 5** иллюстрирует рост опухоли на мышинной модели CT26 рака ободочной кишки после лечения с применением NB0828 или контрольного наполнителя.
- [0016] **Фиг. 6** иллюстрирует уменьшенное внутриопухолевое накопление гранулоцитов /ТAM (опухоль-ассоциированных макрофагов) и макрофагов, смещающихся в сторону M1 фенотипа, у леченных NB0828 мышей, несущих
- 30 CT26 опухоль.
- [0017] **Фиг. 7** иллюстрирует увеличенное накопление CD8+ и CD4+ лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), и увеличение CD8+ TIL функции у леченных NB0828 мышей, несущих CT26 опухоль.

[0018] Фиг. 8 иллюстрирует рост опухоли на мышинной модели MC38 рака ободочной кишки после лечения с применением NB0828 или контрольного наполнителя.

5 **[0019]** Фиг. 9A-9D иллюстрируют, что на модели MC38 рака ободочной кишки NB0828 увеличивает общее количество опухоль-ассоциированных макрофагов (9A), при этом увеличивая провоспалительные макрофаги I типа (9B), и CD8+ T клетки (9C), и что опухолевая эффективность зависит от C8+ T клеток (9D).

10 **[0020]** Фиг. 10A – 10C иллюстрируют, что комбинация PD-1 и NB0828 улучшает ответ на модели MC38 рака ободочной кишки по сравнению с PD-1 отдельно при контролировании как размера опухоли (10A), так и выживания (10B); животные, выжившие после первого заражения, защищены от повторного заражения (10C).

15 **[0021]** Фиг. 11 иллюстрирует, что NB0828 преодолевает резистентность к анти-PD-1 в установленных MC38 опухолях.

[0022] Фиг. 12A-12D иллюстрирует, что в PD-1 резистентных опухолях NB0828 улучшает частоту (12A) и функцию CD8+ TIL (12B), в то время как уменьшает общие TAM (12C) и способствует накоплению иммуностимулирующих M1 TAM (12D).

20

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0023] В последующем описании, представлены определенные специфические подробности для обеспечения понимания различных вариантов осуществления изобретения. Тем не менее, квалифицированный специалист в данной области техники будет понимать, что представленные варианты осуществления могут быть осуществлены без этих деталей. Если в контексте очевидно не указано иначе, то для всего описания и последующих пунктов формулы изобретения, слово “содержат” и его вариации, такие как, “содержит” и “содержащий” следует рассматривать в открытом, включающем значении, то есть как “включая, но не ограничиваясь только ими.” Как используется в описании и пунктах 25 30 приложенной формулы изобретения, признаки, изложенные в единственном числе, включают ссылки на множественное число, если из контекста очевидно не следует иное. Также следует понимать, что термин “или” в целом применяется в его значении, включая “и/или”, если из контекста очевидно не

следует иное. Кроме того, заглавия, представленные в настоящей заявке, указаны только для удобства и не прерывают объем или значения заявленных вариантов осуществления изобретения.

5 **[0024]** Как используется в настоящей заявке, термин “приблизительно” относится к количеству, которое близко к указанному количеству на 10% или меньше.

10 **[0025]** Как используется в настоящей заявке, термин “особь”, “пациент” или “субъект” относится к особям, у которых диагностировано, подозревается наличие или есть риск развития по меньшей мере одного заболевания, для лечения которого пригодны описанные композиции и способ. В определенных вариантах осуществления, особь представляет собой млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кролика, собаку, кошку, лошадь, корову, овцу, свинью, козу, ламу, альпаку или яка. В определенных вариантах осуществления, особь представляет собой человека.

15 **[0026]** Как используется в настоящей заявке, термин “комбинация” или “комбинированное лечение” может относиться либо к одновременному введению компонентов комбинации или последовательному введению компонентов комбинации. Как описано в настоящей заявке, если комбинация 20 относится к последовательному введению компонентов, то компоненты можно вводить в любом временном порядке. Компоненты можно вводить отдельно в разные дни или один день каждый компонент в соответствии со схемой, которая максимизирует биодоступность, уменьшает побочные эффекты, максимизирует терапевтический потенциал, или любой их комбинации.

25 **[0027]** Термины “злокачественное новообразование” и “опухоль” относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое характеризуется нарушением регуляции роста клеток. Злокачественное новообразование представляет собой класс заболеваний, в котором группа клеток проявляет неконтролируемый рост или нежелательный рост. Злокачественные клетки также 30 распространяются в другие локализации, что может приводить к образованию метастаз. Распространение злокачественных клеток в организме может происходить, например, через лимфу или кровь. Неконтролируемый рост, интрузия, и образование метастаз также называются злокачественных свойствами злокачественных опухолей. Эти злокачественные свойства отличают

злокачественные опухоли от доброкачественных опухолей, которые типично не инвазируют или метастазируют.

[0028] Как используется в настоящей заявке, термин “эффективное количество” относится к количеству терапевтического средства, которое вызывает биологический эффект при введении млекопитающему. Биологические эффекты включают, но не ограничиваясь только ими, ингибирование или блокировку взаимодействия рецептора с лигандом, уменьшение ферментативной активности мишени, уменьшение роста опухоли, уменьшение метастазирования опухоли, увеличение инфильтрации CD8⁺ Т клеток в опухолевые сайты, уменьшение общих макрофагов в опухолевых сайтах, увеличение инфильтрации M1 макрофагов, увеличение M1/M2 соотношение или удлинение выживания животного, несущего опухоль. “Терапевтическое количество” представляет собой концентрацию лекарственного средства, рассчитанную для проявления терапевтического эффекта. Терапевтическое количество охватывает диапазон дозировок, способных индуцировать терапевтический ответ в популяции особей. Млекопитающее может представлять собой человека. Человек может быть поражен или подозревается или поражен опухолью.

[0029] Из заявленных антител можно отметить моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и полиреактивные антитела), и фрагменты антител. Антитела включают антитело-конъюгаты и молекулы, содержащие антитела, такие как химерные молекулы. Таким образом, антитело включает, но не ограничиваясь только ими, полноразмерные и нативные антитела, а также их фрагменты и часть, сохраняющие их специфичности связывания, такие как их любая специфически связывающаяся часть, включая те, которые имеют любое число из классов и/или изотипов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE и IgM); и биологически релевантные (антигенсвязывающие) фрагменты или их специфически связывающиеся части, включая, но не ограничиваясь только ими, Fab, F(ab')₂, Fv, и scFv (одноцепочечная или родственная структура). Моноклональное антитело обычно представляет собой антитело в пределах композиции по существу гомогенных антител; следовательно, любые индивидуальные антитела, содержащиеся в композиции на основе моноклональных антител, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут

присутствовать в незначительных количествах. Поликлональное антитело представляет собой препарат, который включает разные антитела с различными последовательностями, которые обычно нацелены на две или больше разных антигенных детерминант (эпитопов). Моноклональное антитело может включать константный участок IgG1 человека. Моноклональное антитело может включать константный участок IgG4 человека.

[0030] Термин “антитело” в настоящей заявке используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, исключая интактные антитела и их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, исключая фрагменты антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, F(ab')₂ фрагменты, Fab' фрагменты, Fv фрагменты, рекомбинантные IgG (rIgG) фрагменты, одноцепочечные фрагменты антител, исключая одноцепочечные переменные фрагменты (sFv или scFv), и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотела). Термин охватывает генетически сконструированные и/или другим образом модифицированные формы иммуноглобулины, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если специально не указано иначе, то термин “антитело” должен пониматься как охватывающий их функциональные фрагменты антител. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, исключая антитела любого класса или подкласса, исключая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA, и IgD. Антитело может включать константный участок IgG1 человека.

Антитело может включать константный участок IgG4 человека.

[0031] Термины “участок, определяющий комплементарность”, и “CDR,” которые являются синонимами с “гиперпеременная область” или “HVR,” известны в данной области техники и относятся к не непрерывным последовательностям аминокислот в пределах переменных участков антитела, которые придают антигенную специфичность и/или связывающую аффинность. В целом, существуют три CDR в каждом переменном участке тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждом переменном участке легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). “Каркасные участки” и “FR” известны в данной области техники и относятся к не-CDR областям переменных участков

тяжелых и легких цепей. В целом, существует четыре FR в каждом полноразмерном вариабельном участке тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3, и FR-H4), и четыре FR в каждом полноразмерном вариабельном участке легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3, и FR-L4). Точные границы аминокислотных последовательностей данного CDR или FR легко могут быть определены с любой из различных хорошо известных схем, исключая те, которые описаны Кэботом и др. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по Кэботу), Al-Lazikani и др., (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации “Чотиа”); MacCallum и др., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” *J. Mol. Biol.* 262, 732-745.” (схема нумерации “Контакт”); Lefranc MP и др., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” *Dev Comp Immunol*, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации “IMGT”); Honegger A и Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” *J Mol Biol*, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации “Aho”); и Whitelegg NR и Rees AR, “WAM: an improved algorithm for modelling антитела on the WEB,” *Protein Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 (схема нумерации “AbM”).

20 **[0032]** Границы данных CDR или FR могут изменяться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Кэбота основана на структурных выравниваниях, в то время как схема Чотиа основана на структурной информации. Нумерация для обеих схем Кэбота и Чотиа основана на длинах наиболее распространенных последовательностей участков антител, с

25 инсерциями, обеспеченными инсерционными буквами, например, “30a,” и делециями, проявляющимися в некоторых антителах. Две схемы помещают определенные инсерции и делеции (“инсерции-делеции”) в различные положения, что приводит к различной нумерации. Схема Контакт основана на анализе комплексных кристаллических структур и во многих аспектах сходна со

30 схемой нумерации Чотиа.

[0033] Термин “вариабельный участок” или “вариабельный домен” относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который задействован в связывание антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела в целом имеют сходные структуры, где

каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три CDR (См., например, Kindt и др. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman и Co., стр. 91(2007)). Одного V_H или V_L домена может быть достаточно для придания специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены, используя V_H или V_L домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных V_L или V_H доменов, соответственно (См., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson и др., *Nature* 352:624-628 (1991)).

[0034] Из заявленных антител следует упомянуть фрагменты антител.

“Фрагмент антитела” относится к молекуле, отличающейся от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которых связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваясь только ими, F_v, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv или sFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В предпочтительных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменный участок тяжелой цепи и/или переменный участок легкой цепи, такие как scFv.

[0035] Фрагменты антител могут быть получены с помощью различных методик, включая, но не ограничиваясь только ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получение с помощью рекомбинантных клеток хозяев. В некоторых вариантах осуществления, антитела представляют собой продуцируемые рекомбинантно фрагменты, такие как фрагменты, содержащие расположения, которые не встречаются в природе, например, в которых два или больше участков или цепей антитела соединены с помощью синтетических линкеров, например, полипептидных линкеров, и/или те, которые не продуцируются путем ферментативного расщепления встречающегося в природе интактного антитела. В некоторых аспектах, фрагменты антител представляют собой scFv.

[0036] “Гуманизованное” антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR имеют происхождение из нечеловеческих CDR и все или по существу все аминокислотные остатки FR имеют происхождение из FR человека. Гуманизованное антитело

необязательно может включать по меньшей мере часть константного участка антитела, имеющего происхождение из антитела человека. “Гуманизированная форма” нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, который подвергнулся гуманизации, типично для уменьшения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, некоторые FR остатки в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого имеют происхождение CDR остатки), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0037] Из заявленных антител следует упомянуть антитела человека. “Антитело человека” представляет собой антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей такой последовательности антитела, продуцируемой человеком или клеткой человека, или источником, отличающимся от человека, который использует репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитела человека, исключая библиотеки антител человека. Термин исключает гуманизированные формы нечеловеческих антител, содержащие нечеловеческие антигенсвязывающие участки, такие как те, в которых все или по существу все CDR являются нечеловеческими.

[0038] Антитела человека могут быть приготовлены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования интактных антител человека или интактных антител с переменными участками человека в ответ на заражение антигеном. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулина человека, в котором заменены эндогенные локусы иммуноглобулина, или которые присутствуют экстрахромосомно или интегрированы случайным образом в хромосомы животного. В таких трансгенных животных, эндогенные локусы иммуноглобулины были созданы инактивированными. Антитела человека также могут иметь происхождение из библиотек антител человека, исключая фаг-дисплейные библиотеки и бесклеточные библиотеки, включающие последовательности, кодирующие антитело, имеющие происхождение из репертуара человека.

[0039] Термины “полипептид” и “белок” используются взаимозаменяемо по отношению к полимеру аминокислотных остатков, и не ограничены минимальной длиной. Полипептиды, выключая заявляемые антитела и цепи антитела и другие пептиды, например, линкеры и связывающие пептиды, могут
5 включать аминокислотные остатки, выключая природные и/или не природные аминокислотные остатки. Термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиалилирование, ацетилирование, фосфорилирование и другие. В некоторых аспектах, полипептиды могут содержать модификации по отношению к нативной или
10 природной последовательности, до тех пор, пока белок сохраняет желательную активность. Эти модификации могут быть предусмотрены, путем использования сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, вследствие мутаций в хозяевах, которые продуцируют белки, или ошибок при ПЦР амплификации.

[0040] Процент (%) идентичности последовательности относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательности и интродукции
20 при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые
25 известны для специалиста в данной области, например, используя публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине
30 сравниваемых последовательности. Однако для целей настоящего изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой

Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранения вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration, № TXU510087. Программа ALIGN-2 является публично доступной от фирмы Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., или ее можно компилировать из исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть компилирована для применения в операционной системе UNIX, включая цифровой UNIX V4.0D. Все параметры для сравнения последовательностей являются заданными в программе ALIGN-2 и не должны изменяться.

10 **[0041]** В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А к, относительно, или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В (которую альтернативно можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или включает 15 определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, относительно, или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В), рассчитывают следующим образом: $100 \times \text{частное } X/Y$, где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного выравнивания последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и В, и где Y 20 обозначает общее количество аминокислотных остатков в В. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности В не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности В относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящей заявки все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно 25 процедуре, описанной в последнем из предшествующих абзацев, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

30 **[0042]** В некоторых вариантах осуществления, в настоящей заявке охватывают варианты аминокислотных последовательностей антител. Вариант типично отличается от полипептида, специфически раскрытого в настоящей

заявке, одной или несколькими заменами, делециями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут быть встречающимися в природе или могут быть созданы синтетически, например, путем модификации одной или нескольких вышеуказанных полипептидных последовательностей согласно изобретению и оценки одной или нескольких биологических активностей полипептида, как описано в настоящей заявке, и/или используя любую из различных известных технологий. Например, может являться желательным улучшать связывающую аффинность и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела могут быть приготовлены путем интродукции подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из, и/или инсерции в и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей антитела. Любая комбинация делеции, инсерции и замены может приводить к получению конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желательными характеристиками, *например*, связыванием антигена.

[0043] В некоторых вариантах осуществления, обеспечиваются варианты антител, имеющие одну или несколько аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для мутагенеза путем замены, включают CDR и FR. Аминокислотные замены могут быть интродуцированы в антитело, представляющее интерес, и продукты подвергаться скринингу относительно желательной активности, *например*, сохраненного/улучшенного связывания антигена, снижения иммуногенности, или улучшения ADCC или CDC.

[0044] В некоторых вариантах осуществления, замены, инсерции или делеции могут встречаться в пределах одного или нескольких CDR, где замены, инсерции или делеции существенно не уменьшают связывание антитела с антигеном. Например, консервативные замены, которые существенно не уменьшают связывающую аффинность, могут быть осуществлены в CDR. Такие изменения могут быть проведены за пределами “горячих точек” CDR. В некоторых вариантах осуществления вариантов последовательностей V_H и V_L , каждый CDR остается неизменным.

[0045] Изменения (*например*, замены) могут быть осуществлены в CDR, *например*, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть осуществлены в CDR кодирующих кодонах с высокой частотой мутаций во

время соматического созревания (См., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и полученный вариант может быть тестирован для определения связывающей аффинности. Созревание аффинности (например, используя ПЦР пониженной точности, перестановку цепей, рандомизацию CDR, или олигонуклеотид-направленный мутагенез) можно использовать для улучшения аффинности антитела (См., например, Hoogenboom и др. в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). CDR остатки, задействованные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование (См., например, Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989)). В особенности часто мишенями являются CDR-H3 и CDR-L3. Альтернативно, или дополнительно, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть мишенями или элиминированы в качестве кандидатов для замены. Варианты могут подвергаться скринингу для определения того, будут ли они содержать желательные свойства.

[0046] Инсерции и делеции аминокислотных последовательностей включают амино- и/или карбоксил-концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или больше остатков, а также инсерции и делеции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерциональные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который повышает время полужизни антитела в сыворотке крови. Примеры вариантов инсерций внутри последовательности молекул антитела включают инсерцию 3 аминокислот в легкую цепь. Примеры концевых делеций включают антитело с делецией 7 или меньше аминокислоты на конце легкой цепи.

[0047] В некоторых вариантах осуществления, антитела изменяют для повышения или снижения их гликозилирования (например, путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создают или удаляют один или несколько сайтов гликозилирования). Может быть изменен углевод, присоединенный к Fc участку антитела. Нативные антитела из клеток млекопитающих типично содержат разветвленный, биантенарный олигосахарид,

присоединенный с помощью N-связи к Asn₂₉₇ СН₂ домена Fc участка (См., например, Wright и др. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)). Олигосахарид может представлять собой различные углеводы, например, маннозу, N-ацетил глюкозамин (GlcNAc), галактозу, сиаловую кислоту, фукозу, присоединенную к

5 GlcNAc в стволе биантенарной олигосахаридной структуры. Могут быть осуществлены модификации олигосахаридов в антителе, например, для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами. Варианты гликозилирования антитела могут обладать улучшенной ADCC и/или CDC функцией. В некоторых вариантах осуществления, обеспечиваются варианты

10 антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (непосредственно или опосредованно) к Fc-участку. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи на Asn₂₉₇, относительно

15 суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn₂₉₇ (См., например, WO 08/077546). Asn₂₉₇ относится к остатку аспарагина, расположенному приблизительно в положении 297 в Fc-участке (EU нумерация остатков Fc-участка; См., например, Edelman и др. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May; 63(1):78–85). Тем не менее, Asn₂₉₇ также может быть расположен

20 приблизительно ±3 аминокислоты против хода транскрипции или по ходу транскрипции от положения 297, то есть, между положениями 294 и 300, вследствие минорных вариаций последовательностей в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную ADCC функцию (См., например, Okazaki и др. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); и Yamane-Ohnuki и др. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)). Можно использовать клеточные линии,

25 например, нокаутные клеточные линии и способы их применения для получения дефукозилированных антител, например, Lec13 CHO клетки, дефицитные по белку фукозилирования и гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) нокаутные CHO клетки (См., например, Ripka и др. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Yamane-Ohnuki и др. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. и др., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)). Также включены другие варианты гликозилирования антител (См., например, Патент US № 6,602,684).

30

[0048] В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть интродуцированы в Fc-участок

антител, раскрытых в настоящей заявке, таким образом создавая вариант Fc- участка. Fc-участок в контексте настоящего изобретения представляет собой C-концевой участок тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит по меньшей мере часть константного участка. Fc-участок включает нативные последовательности Fc-участков и вариантов Fc-участков. Вариант Fc-участка может включать последовательность Fc-участка человека (*например*, Fc-участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащий аминокислотную модификацию (*например*, замену) в одной или нескольких аминокислотных положениях.

10 **[0049]** В некоторых вариантах осуществления, антитела согласно настоящему описанию представляют собой варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает их благоприятным кандидатом для применений, в которых время полужизни антитела *in vivo* является важным, при этом определенные эффекторные функции (такие как комплемент- и ADCC) не являются необходимыми или вредными. Могут быть созданы анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения уменьшения /истощения CDC и/или ADCC активностей. Например, могут быть созданы анализы связывания Fc рецептора (FcR) для подтверждения того, что в антителе отсутствует FcγR связывание (следовательно, вероятно отсутствует ADCC активностью), но сохраняется FcRn связывающая способность.

Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки ADCC активности молекулы, представляющей интерес, описаны в патентах US № 5,500,362 и 5,821,337. Альтернативно, можно применять методы нерадиоактивных анализов (*например*, АСТИ™ и CytoTox 96® нерадиоактивные анализы цитотоксичности). Пригодные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), моноциты, макрофаги, и клетки - естественные киллеры (NK).

30 **[0050]** Антитела, которые имеют увеличенные периоды полужизни и улучшенное связывание с неонатальным Fc рецептором (FcRn) (*См.*, *например*, US 2005/0014934). Такие антитела могут содержать Fc-участок с одной или несколькими заменами в этом месте, которые улучшают связывание Fc-участка с FcRn, и включают те с заменами в одном или нескольких остатках Fc-участка: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 в соответствии с системой нумерации EU (*См.*,

например, патент US № 7,371,826). Также охватываются другие примеры вариантов Fc-участка (*См., например*, Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патенты US №№ 5,648,260 и 5,624,821; и WO94/29351).

[0051] В некоторых вариантах осуществления, может являться желательным создавать цистеиновые сконструированные антитела, например, “thioMAb”, в которых один или несколько остатков антитела заменены остатками цистеина. В некоторых вариантах осуществления, замена остатков в достижимых сайтах антитела. Реакционноспособные тиольные группы установлены в сайты для конъюгации с другими компонентами, такими как компоненты лекарственных средств или линкерных компонентов лекарственных средств, для создания иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления, любой один или несколько следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация по Кэботу) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-участка тяжелой цепи.

[0052] В некоторых вариантах осуществления, антитело, раскрытое в настоящей заявке, дополнительно может быть модифицировано для содержания дополнительных небелковоподобных компонентов, которые известны и доступны. Компоненты, подходящие для дериватизации антитела, включают, но не ограничиваясь только ими, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваясь только ими, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры или случайные сополимеры), и декстран или поли(н винил пирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида /этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (*например*, глицерин), поливиниловый спирт, и их смеси. Полиэтиленгликоль пропиональдегид могут иметь преимущество для приготовления вследствие перекрывающей стабильности в воде. Полимер может иметь любой молекулярный вес и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может изменяться, и если присоединено два или больше полимеров, то они могут являться одинаковыми или различными молекулами.

[0053] Антитела, описанные в настоящей заявке, могут кодироваться нуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота представляет собой тип полинуклеотида, содержащий два или больше нуклеотидных оснований. В определенных вариантах осуществления, нуклеиновая кислота является компонентом вектора, который может использоваться для переноса полинуклеотида, кодирующего полипептид, в клетку. Как используется в настоящей заявке, термин “вектор” относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой геномный интегрированный вектор, или “интегрированный вектор”, который может становиться интегрированным в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Другой тип вектора представляет собой “эписомный” вектор, например, нуклеиновую кислоту, способную к экстрахромосомной репликации. Векторы, способные направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны, обозначаются в настоящей заявке как “экспрессионные векторы”. Подходящие векторы включают плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей, вирусные векторы и другие. В экспрессионных векторах регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования для применения для контроля транскрипции могут иметь происхождение из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Дополнительно может быть инкорпорирована способность реплицироваться в хозяине, обычно придаваемая началом репликации, и селективируемый ген, для облегчения распознавания трансформантов. Могут применяться векторы, имеющие происхождение из вирусов, таких как лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы и другие. Плазмидные векторы могут быть линейаризованы для интеграции с хромосомное расположение. Векторы могут содержать последовательности, которые направляют сайт-специфическую интеграцию в желательное расположение или ограничивают набор сайтов в геноме (например, AttP-AttB рекомбинация). Дополнительно, векторы могут содержать последовательности, имеющие происхождение из транспозируемых элементов.

[0054] Как используется в настоящей заявке, термины “гомологичный”, “гомология” или “процент гомологии” при использовании в настоящей заявке для описания аминокислотной последовательности или последовательности

нуклеиновых кислот, относительно эталонной последовательности, могут быть определены, используя формулу, описанную Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, модифицированную, как описано в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Такая формула включена в программы средств поиска основного локального выравнивания (BLAST) от Altschul и др. (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Процент гомологии последовательностей может быть определен, используя самую последнюю версию BLAST, для даты подачи настоящей заявке.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- [0055]** Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, описанные в настоящей заявке, можно использовать для инфицирования, трансфектирования, трансформирования или придания другим способам подходящей клетке трансгенности по отношению к нуклеиновой кислоте, таким образом предоставляя возможность продукции антител для коммерческих или терапевтических применений. Стандартные клеточные линии и способы для получения антител из клеточных культур в промышленном масштабе известны в данной области техники. См., например, Li и др., "Cell culture processes for monoclonal antibody production." *Mabs*. 2010 Sep-Oct; 2(5): 466-477. В определенных вариантах осуществления, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В определенных вариантах осуществления, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0 мышинной миеломы или клетку PER.C6®. В определенных вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, интегрирована в геномный локус клетки, пригодной для продукции антител. В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ получения антитела, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в условиях *in vitro*, достаточных для осуществления продукции и секреции указанного антитела.
- [0056]** В определенных вариантах осуществления, в настоящей заявке описан главный клеточный банк, включающий: (а) клеточную линию млекопитающих, содержащую одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, описанное в настоящей заявке, интегрированных в геномное расположение; и (б) криопротектор. В определенных вариантах осуществления, криопротектор

включает глицерин. В определенных вариантах осуществления, главный клеточный банк включает: (а) клеточную линию СНО, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело с (I) аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, по меньшей на 90% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13; и (II) аминокислотной последовательностью легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, интегрированную в геномное расположение; и (б) криопротектор. В определенных вариантах осуществления, криопротектор включает глицерин. В определенных вариантах осуществления, главный клеточный банк содержится в подходящем флаконе или контейнере, способным выдерживать замораживание в жидком азоте.

[0057] Также в настоящей заявке описаны способы получения антитела, раскрытого в настоящей заявке. Такие способы включают инкубирование клетки или клеточной линии, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в клеточной культуральной среде в условиях, достаточных для обеспечения экспрессии и секретирования антитела, и дальнейший сбор антитела из клеточной культуральной среды. Сбор может дополнительно включать содержат одну или несколько стадии очистки для удаления живых клеток, клеточного дебриса, неантительных белков или полипептидов, нежелательных солей, буферов и компонентов среды. В определенных вариантах осуществления, дополнительная (ые) стадия (и) включают центрифугирование, ультрацентрифугирование, очистку с помощью белка А, белка G, белка A/G, или белка L и/или ионообменную хроматографию.

Антитела к периостину

[0058] В настоящей заявке описаны антитела, которые блокируют функцию периостина. Такие антитела пригодны для лечения злокачественного новообразования. Антитела, описанные в настоящей заявке, снижают содержание коллагена в опухолях, уменьшают инфильтрацию гранулоцитов и опухоль-ассоциированных макрофагов, при этом увеличивая поляризацию макрофагов к M1 фенотипу, и увеличивают накопление и противоопухолевые свойства Т-клеток, инфильтрирующих опухоль. В определенных вариантах осуществления, антитела к периостину снижают содержание коллагена в опухоли по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, или 40% по сравнению с нелеченной или контрольной леченной особью. В

определенных вариантах осуществления, антитела к периостину уменьшают инфильтрацию гранулоцитов и опухоль-ассоциированных макрофагов по меньшей мере приблизительно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, или 50% по сравнению с нелеченной или контрольной леченной особью. В определенных вариантах осуществления, антитела к периостину уменьшают инфильтрацию CD11b+ клеток по меньшей мере приблизительно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, или 50% по сравнению с нелеченной или контрольной леченной особью. В определенных вариантах осуществления, антитела к периостину увеличивают поляризацию опухоль-ассоциированных макрофагов в M1 тип (CD11b+, MHC класс II+, CD206-) по меньшей мере приблизительно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, или 50% по сравнению с нелеченной или контрольной леченной особью. В определенных вариантах осуществления, антитела к периостину увеличивают накопление CD4+ и/или CD8+ Т клеток в опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, или 50% по сравнению с нелеченной или контрольной леченной особью. В определенных вариантах осуществления, антитела к периостину увеличивают продукцию гамма-интерферона инфильтрирующих опухоль CD8+ Т клеток по меньшей мере приблизительно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, или 50% по сравнению с нелеченной или контрольной леченной особью.

20 **[0059]** В настоящей заявке описано рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывает периостин, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG); (б) тяжелую

25 цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT), или 6 (ISAYDGNT); (в) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8

30 (DVLVVPFDY), или 9 (DMLVVPFDY); (г) легкую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR); (д) легкую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-L2) amino, содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 11 (SND); (е) и легкую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-L3),

содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV). В определенных вариантах осуществления, антитело представляет собой гуманизированное или химерное антитело. В определенных вариантах осуществления, антитело представляет собой IgG антитело. В определенных вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, может включать Fc часть с отсутствием эффекторной функции. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет IC50 меньше чем приблизительно 50 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет IC50 меньше чем приблизительно 40 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет IC50 меньше чем приблизительно 30 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей.

[0060] Также в настоящей заявке описано рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывает периостин, содержащее тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина: (а) где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13; и (б) где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под номером 55 в SEQ ID NO 13: представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин. В определенных вариантах осуществления, антитело представляет собой IgG антитело. В определенных вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящей заявке, может включать Fc часть с отсутствием эффекторной функции. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет IC50 меньше чем приблизительно 50 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет IC50 меньше чем приблизительно 40

наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет IC50 меньше чем приблизительно 30 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей.

Ингибиторы PD-1 оси

[0061] Ось PD-1 представляет собой путь передачи сигналов, посредством которого PD-1 проявляет ингибирующий эффект на Т-клеточную иммунную реакцию и включает взаимодействие PD-1 с PDL-1 или PDL-2. Полипептиды и антитела, которые связываются с периостином, описанные в настоящей заявке, можно комбинировать с ингибитором PD-1 оси и применять в способе лечения опухоли, злокачественного новообразования или другого новообразования. В определенных вариантах осуществления, полипептиды и антитела, которые связываются с периостином, описанные в настоящей заявке, можно комбинировать с ингибитором PD-1 оси в фармацевтической композиции, пригодной для лечения опухоли, злокачественного новообразования или другого новообразования. NB0828 антитело, описанное в настоящей заявке, можно комбинировать с ингибитором PD-1 оси и применять в способе лечения опухоли, злокачественного новообразования или другого новообразования. В определенных вариантах осуществления, NB0828 антитело, описанное в настоящей заявке, можно комбинировать с ингибитором PD-1 оси в фармацевтической композиции, пригодной для лечения опухоли, злокачественного новообразования или другого новообразования.

[0062] Ингибитор PD-1 оси, используемый в композициях и способах согласно настоящему изобретению, может ингибировать передачу сигналом посредством PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274), или PDL-2 (CD273). Ингибитор может представлять собой антитело или фрагмент антитела, слитую конструкцию на основе растворимого лиганда и Fc-фрагмента, или низкомолекулярный ингибитор. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси включает антитело или Его PD-1 связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) специфически связывает с PD-1 (CD279), включает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514 (MEDI0680), спартализумаб, тислелизумаб (BGB-A317),

пидилизумаб, предпочтительно эзабенлимаб (CAS # 2249882-54-8) (анти-PD-1 антитела), или его PD-1 (CD279) связывающий фрагмент.

[0063] Специфически, молекула антитела к PD-1, описанная в настоящей заявке, представляет собой эзабенлимаб, содержащий тяжелую цепь,

5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO.:19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO.:20.

[0064] В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси представляет собой PD-L2 Fc слитый белок (например, AMP-224). В

10 определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси включает антитело или PDL-1 связывающий фрагмент, который (ое) специфически связывается с

PDL-1 (CD274). В определенных вариантах осуществления, антитело или

антигенсвязывающий фрагмент, который (ое) специфически связывается с PDL-1 (CD274), включает дурвалумаб (MEDI 4376), атезолизумаб (MPDL3280A),

15 авелумаб (MSB0010718C), BMS-936559 (MDX-1105), MEDI0680 (AMP-514),

цемиплимаб (REGN2810), торипалимаб (JS001-PD-1), камрелизумаб (SHR-1210), достарлимаб (TSR-042), цетрелимаб (JNJ-63723283), или FAZ053, или его PDL-1

(CD274) связывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси включает антитело или его PDL-2 связывающий фрагмент, который (ое) специфически связывается с PDL-2 (CD273).

20 **[0065]** В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси включает один или несколько низкомолекулярных ингибиторов, таких как N-{2-[(2-

метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-

ил}метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-

25 дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-

серин гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-

дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-

гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-

30 фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1h-индол; L-α-Глутамин,

N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-

фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-

глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-

изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-

ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; Глицинамид, N-(2-

меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-

гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический (1→14)-тиоэфир; или его производное или аналог.

[0066] В определенных вариантах осуществления, ингибиторы PD-1 оси могут вводиться любым путем, подходящим для введения низкомолекулярного пептида или фармацевтической композиции, содержащей антитело, таким как, например, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутривенным, внутримозговым или пероральным. В определенных вариантах осуществления, антитела, ингибирующие PD-1 ось, вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления, антитела, ингибирующие PD-1 ось, вводят в подходящей схеме дозирования, например, раз в неделю, два раза в неделю, ежемесячно, два раза в месяц, один раз в две недели, один раз в три недели, или один раз в четыре недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, или 20 мг/кг. В одном примере, Дурвалумаб можно вводить в дозировке приблизительно 10 мг/кг один раз в две недели.

[0067] В определенных вариантах осуществления, введение особи ингибиторов PD-1 оси может осуществляться в фиксированном уровне дозирования в диапазоне от приблизительно 100 миллиграмм до приблизительно 1000 миллиграмм. В определенных вариантах осуществления, введение особи

ингибиторов PD-1 оси может осуществляться в фиксированном уровне дозирования в диапазоне от приблизительно 200 миллиграмм до приблизительно 800 миллиграмм, в диапазоне от приблизительно 200 миллиграмм до приблизительно 600 миллиграмм, в диапазоне от приблизительно 200 миллиграмм до приблизительно 500 миллиграмм, в диапазоне от приблизительно 300 миллиграмм до приблизительно 500 миллиграмм. В определенных вариантах осуществления, введение особи ингибиторов PD-1 оси может осуществляться в фиксированном уровне дозирования приблизительно 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 миллиграмм. В определенных вариантах осуществления, введение особи ингибиторов PD-1 оси может осуществляться на уровне, подходящем для монотерапии. Например, Ниволумаб можно вводить в дозировке приблизительно 240 миллиграмм каждые две недели или приблизительно 480 миллиграмм каждые четыре недели. В другом примере Пембролизумаб можно вводить приблизительно в дозе 200 миллиграмм один раз в три недели.

Терапевтические способы

[0068] Антитела, описанные в настоящей заявке, представляют собой антитела, пригодные для лечения злокачественного новообразования или опухоли. Лечение относится к способу, который направлен на улучшение или облегчение состояния, подвергаемого лечению. По отношению к злокачественному новообразованию, лечение включает, но не ограничиваясь только ими, уменьшение объема опухоли, уменьшение роста объема опухоли, увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания, или общей продолжительности жизни. В определенных вариантах осуществления, лечение будет вызывать ремиссию злокачественного новообразования, подвергаемого лечению. В определенных вариантах осуществления, лечение охватывает применение в качестве профилактической или поддерживающей дозы, предназначенной для предотвращения повторного развития или прогрессирования ранее леченного злокачественного новообразования или опухоли. Для специалиста в данной области техники будет понятным, что, в то время как антитело может быть безопасным и эффективным, не все индивидуумы отвечают одинаково на вводимое лечение, хотя все равно эти индивидуумы рассматриваются как подвергаемые лечению.

[0069] Способы, описанные в настоящей заявке, также охватывают способы лечения особей со злокачественным новообразованием путем введения комбинации ингибитора PD-1 оси и антитела, связывающего периостин. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси и антитело, связывающее периостин можно вводить отдельно. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси и антитело, связывающее периостин, можно вводить отдельно в один и тот же день лечения. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси и антитело, связывающее периостин, можно вводить отдельно каждый в соответствии со своей схемой введения. В определенных вариантах осуществления, схемы отдельного введения созданы для максимизации PK/PD характеристик каждого ингибитора. В определенных вариантах осуществления, антитело, связывающее периостин, включает NB0828 или антитело с CDR из NB0828. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси включает эзабенлимаб (CAS # 2249882-54-8) или антитело с CDR из эзабенлимаба, как описано в настоящей заявке.

[0070] В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование или опухоль представляет собой солидное злокачественное новообразование или опухоль. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование или опухоль представляет собой злокачественное новообразование или опухоль крови. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование или опухоль включает опухоли молочной железы, сердца, легких, тонкого кишечника, толстого кишечника, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы, шеи, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек или печени. В определенных вариантах осуществления, опухоли или злокачественные новообразования, которые могут подвергаться лечению с применением антител согласно изобретению, включают аденому, аденокарциному, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и/или тератому. В определенных вариантах осуществления, опухоль/злокачественное новообразование выбирают из группы, включающей акральную лентицинозную меланому, актинический

кератоз, аденокарциному, аденокистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, астроцитарные опухоли, карциному бартолиновой железы, базально-клеточную карциному, карциному бронхиальной железы, капиллярный карциноид, карциному, карциносаркому, холангиокарциному, хондросаркому, цистаденому, опухоль эндодермального синуса, гиперплазию эндометрия, эндометриальную стромальную саркому, эндометриоидную аденокарциному, эпендимальную саркому, саркому Свинга, фокальную нодулярную гиперплазию, гастроному, опухоли зародышевых линий, глиобластома, глюкагоному, гемангиобластома, гемангиоэндотелиому, гемангиому, аденому печени, аденоматоз печени, гепатоклеточную карциному, инсулит, интраэпителиальное новообразование, интраэпителиальное плоскоклеточное новообразование, инвазивную плоскоклеточную карциному, крупноклеточную карциному, липосаркому, карциному легких, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лейомиосаркому, меланому, злокачественную меланому, злокачественную мезотелиальную опухоль, опухоль оболочки нерва, медуллобластома, медуллоэпителиому, мезотелиому, мукоэпидермоидную карциному, миелоидный лейкоз, нейробластома, нейроэпителиальную аденокарциному, нодулярную меланому, остеосаркому, карциному яичников, папиллярную серозную аденокарциному, опухоли гипофиза, плазмацитому, псевдосаркому, карциному предстательной железы, легочную бластома, почечно-клеточную карциному, ретинобластома, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, карциному мягких тканей, опухоль, секретирующую соматостатин, сквамозную карциному, плоскоклеточную карциному, недифференцированную карциному, увеальную меланому, бородавчатую карциному, карциному влагалища/наружных женских половых органов, ВИПому и опухоль Вильма. В определенных вариантах осуществления, опухоль/злокачественное новообразование, подвергается лечению с применением одного или нескольких антител согласно изобретению, включает рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, пре-B-клеточную острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому степени II, III или IV, глиобластома, мультиформную глиобластома, мелкоклеточный рак, и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких,

метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы, аденокарциному предстательной железы, и рак молочной железы, предпочтительно протоковый рак груди, и/или карциному молочной железы. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергаемое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает глиобластому. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергаемое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергаемое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак яичников. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергаемое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак легких. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергаемое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак предстательной железы. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергаемое лечению с применением антител согласно настоящему изобретению, включает рак ободочной кишки. В определенных вариантах осуществления, злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак ободочной кишки, рак предстательной железы или рак легких. В определенном варианте осуществления, злокачественное новообразование трудно поддается лечению с применением другой терапии. В определенном варианте осуществления, леченное злокачественное новообразование является рецидивирующим. В определенном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой рецидивирующую / трудно поддающуюся лечению глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак ободочной кишки, рак предстательной железы или рак легких.

[0071] В определенных вариантах осуществления, антитела можно вводить нуждающемуся субъекту, любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, таким как, например, подкожным, внутрибрюшинным, внутривенным, внутримышечным,

внутриопухолевым, или внутримозговым, и т.д. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят подкожно. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят внутриопухолево. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят в подходящей схеме дозирования, например, раз в неделю, два раза в неделю, ежемесячно, два раза в месяц, один раз в две недели, один раз в три недели, или один раз в месяц и т.д. В определенных вариантах осуществления, антитела вводят один раз в три недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество находится в диапазоне от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Терапевтически эффективные количества включают количества, которые являются достаточными для ослабления одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, или поражением, поддаваемым лечению.

Схемы применения комбинированных терапий

[0072] Комбинированное лечение, включающее антитело или полипептид, связывающее (ий) периостин, и ингибитор PD-1 оси, можно вводить различными путями. Антитело или полипептид, связывающее (ий) периостин, и ингибитор PD-1 оси можно вводить в одно и то же время в той же самой схеме приема, или в разное время и в разных схемах. Если введение осуществляется в одно и то же время, то введение может осуществляться с помощью отдельных препаратов или одного препарата, содержащего как полипептид, связывающий периостин, так и ингибитор PD-1 оси. Способы введения могут быть смешаны, например, полипептид, связывающий периостин, можно вводить внутривенно, в то время как ингибитор PD-1 оси можно вводить перорально или путем парентеральной инъекции. В определенных вариантах осуществления, полипептид, связывающий периостин, вводят внутривенно, парентерально, подкожно, внутриопухолево, или перорально. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси

вводят внутривенно, парентерально, подкожно, внутриопухолево, или перорально.

5 **[0073]** Если комбинированное лечение вводят особи в одной и той же смеси, то полипептид, связывающий периостин, и ингибитор PD-1 оси можно вводить раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, или один раз в четыре недели. Полипептид, связывающий периостин, и ингибитор PD-1 оси можно вводить отдельно или в виде одного препарата. NB0828 и ингибитор PD-1 оси можно вводить отдельно или в виде одного препарата.

10 **[0074]** Если комбинированное лечение вводят особи в разной схеме, то полипептид, связывающий периостин, и ингибитор PD-1 оси можно чередовать. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси можно вводить особи один или несколько раз перед введением полипептида, связывающего периостин. Полипептид, связывающий периостин, можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, или 6 дней после введения ингибитора PD-1 оси. Полипептид, связывающий периостин, можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, или 4 недель введения ингибитора PD-1 оси. NB0828 антитело можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, или 6 дней после введения ингибитора PD-1 оси. NB0828 антитело можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, или 4 недель введения ингибитора PD-1 оси.

20 **[0075]** Полипептид, связывающий периостин, можно вводить особи один или несколько раз перед введением ингибитора PD-1 оси. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, или 6 дней после введения полипептида, связывающего периостин. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, или 4 недель после введения полипептида, связывающего периостин. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, или 6 дней после введения NB0828 антитела. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 оси можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, или 4 недель после введения NB0828 антитела.

30 **[0076]** В определенных вариантах осуществления, полипептид, связывающий периостин, можно вводить особи раз в неделю и ингибитор PD1-оси можно вводить особи каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или

недели. В определенных вариантах осуществления, NB0828 можно вводить особи один раз в четыре недели и ингибитор PD1-оси можно вводить особи каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели.

5 [0077] Комбинированное лечение в соответствии с настоящей заявкой может включать комбинации, где один или оба активных компонента (например, полипептид, связывающий периостин, и ингибитор PD-1) сами по себе не являются эффективными, но эффективны при введении в виде части комбинированного лечения. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 вводят на уровне, неэффективном для монотерапии, но эффективном в комбинации с полипептидом, связывающим периостин. В определенных вариантах осуществления, ингибитор PD-1 вводят на уровне, неэффективном для монотерапии, но эффективном в комбинации с NB0828 антителом. В определенных вариантах осуществления, полипептид, связывающий периостин, вводят на уровне, неэффективном для монотерапии, но эффективном в комбинации с ингибитором PD-1. В определенных вариантах осуществления, NB0828 вводят на уровне, неэффективном для монотерапии, но эффективном в комбинации с ингибитором PD-1. В определенных вариантах осуществления, оба компонента, и полипептид, связывающий периостин, и ингибитор PD-1 вводят на уровне, неэффективном для монотерапии, но эффективном в комбинации. В определенных вариантах осуществления, оба компонента, и NB0828, и ингибитор PD-1 вводят на уровне, неэффективном для монотерапии, но эффективном в комбинации.

Фармацевтически приемлемые наполнители, носители и разбавители

25 [0078] В определенных вариантах осуществления, антитела к периостину согласно настоящему изобретению включены в фармацевтическую композицию, содержащую один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, носителей и разбавителей. В определенных вариантах осуществления, антитела согласно настоящему изобретению суспендированы в стерильном растворе. В определенных вариантах осуществления, раствор содержит 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления, раствор дополнительно содержит один или несколько следующих компонентов: буферы, например, ацетат, цитрат, гистидин, сукцинат, фосфат, бикарбонат и гидроксиметиламинометан (Tris); поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 80 (Tween 80),

полисорбат 20 (Tween 20), и полоксамер 188; полиол/дисахарид/полисахариды, например, глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40; аминокислоты, например, глицин или аргинин; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислота, метионин; или хелатообразующие вещества, например, EDTA или EGTA.

[0079] В определенных вариантах осуществления, антитела согласно настоящему изобретению транспортируются /хранятся лиофилизированными и восстанавливаются перед введением. В определенных вариантах осуществления, лиофилизированные препараты антител содержат объемобразующий агент, такой как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза, декстран 40 или их комбинации. Лиофилизированный препарат может содержаться во флаконе, состоящем из стекла или другого подходящего химически инертного материала. Антитела при приготовлении в виде препарата, независимо от того, восстанавливаются они или нет, могут быть забуферены при определенном значении pH, обычно меньше, чем 7,0. В определенных вариантах осуществления, значение pH может находиться в диапазоне 4,5 и 6,5, 4,5 и 6,0, 4,5 и 5,5, 4,5 и 5,0, или 5,0 и 6,0.

[0080] Также в настоящей заявке описаны наборы, содержащие одно или несколько антител, описанных в настоящей заявке, в подходящем контейнере и один или несколько дополнительных компонентов, выбранных из: инструкций для применения; разбавителя, наполнителя, носителя и устройства для введения.

[0081] В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ приготовления лечения злокачественного новообразования, включающий смешивание одного или нескольких фармацевтически приемлемых наполнителей, носителей или разбавителей и антитела согласно настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления, в настоящем изобретении описан способ приготовления лечения злокачественного новообразования для хранения или транспортировки, включающий лиофилизирование одного или нескольких антител согласно настоящему изобретению.

ПРИМЕРЫ

[0082] Последующие иллюстративные примеры характеризуют варианты осуществления композиций и способов, описанных в настоящей заявке, и никоим образом не должны пониматься как ограничивающие.

Пример 1 – Создание и скрининг антител

[0083] Была проведена кампания по открытию фагового дисплея антител для выделения связывающих веществ к периостину, используя библиотеку полностью человеческих фагов. Вкратце, осуществляли три цикла пэннинга, используя либо рекомбинантный человеческий периостин, рекомбинантный мышиный периостин или их комбинации, с упором на идентификацию мышиных перекрестно-реагирующих связывающих агентов. На основании этой стратегии пэннинга, были идентифицирована 78 ScFv с уникальной последовательностью, которые перекрестно реагируют с мышиным периостином и продуцировали в формат IgG1 человека для функционального скрининга в анализе адгезии клеток. См. **Фиг. 1**.

[0084] Рекомбинантным или мышиным периостином покрывали планшеты на 96 лунок в течение ночи при 4°C. На следующий день, планшеты промывали PBS и блокировали 2% BSA в течение 1 часа при 37°C. После блокирования, в планшеты добавляли антитела и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. После инкубирования, затем в лунки добавляли 50000 IMR90 клеток фибробластов легких человека или 50000 MLG клеток фибробластов мышей и предоставляли возможность инкубировать в течение 2 часов при 37°C. Затем планшеты промывали два раза PBS и измеряли конфлюентность лунок, используя платформу IncuCyte. В результате скрининга однократной дозы в высокой концентрации при 500 нМ, было идентифицировано 21 IgG, которые имели >50% ингибирование, как показано на **Фиг. 1**, и они были перенесены на связывающие скрининги для определения относительных аффинностей к человеческому и мышиному периостину, как показано в **Таблице 1** ниже.

[0085] Для определения относительных аффинностей к рекомбинантному человеческому или мышиному периостину, этими белками покрывали планшеты maxisorp в течение ночи при 4°C. На следующий день, планшеты блокировали с помощью казеинового блокирующего буфера в течение 1 час при 37°C. Титрования каждого антитела добавляли к планшетами и предоставляли возможность связываться в течение 1 часа при КТ. Планшеты промывали 4x с помощью PBST, после этого инкубировали с конъюгированным с HRP анти-человеческими Fc вторичным в течение 30 минут при КТ. После этого планшеты снова промывали с помощью 4x PBST и затем разрабатывали, используя TMB субстрат и 1M HCl. В результате этого скрининга, отбирали 4 клон (**Таблица 1**,

выделены жирным шрифтом и курсивом), которые имели значения EC50 связывания <1 нМ, как к человеческому, так и мышинному периостину.

Таблица 1. Значения EC50 связывания с человеческим и мышинным периостином для 21 IgG, идентифицированных в одноклеточном анализе клеточной адгезии, показанном на Фиг. 1.							
EC50 (нМ)	<i>NB0625</i>	<i>NB0627</i>	NB0629	<i>NB0639</i>	NB0640	NB0765	NB0776
HuPOSTN	1,03	0,07	0,09	0,10	9,30	1,08	36,60
MoPOSTN	0,14	0,11	6,08	0,12	6,41	2,41	н.н.
EC50 (нМ)	NB0784	NB0791	NB0792	<i>NB0794</i>	NB0798	NB0800	NB0801
HuPOSTN	4,68	н.н.	59,43	0,08	0,48	н.н.	25,16
MoPOSTN	32,76	н.н.	158,50	0,35	62,02	н.н.	22,36
EC50 (нМ)	NB0802	NB0803	NB0804	NB0805	NB0806	NB0815	NB0816
HuPOSTN	18,75	19,30	н.н.	н.н.	н.н.	1,05	1,00
MoPOSTN	25,02	27,44	н.н.	н.н.	н.н.	55,79	н.н.
Следует отметить, что н.н. означает, что при анализе не наблюдали насыщения.							

Пример 2-Создание NB0828 и вариантов последовательностей

- 5 **[0086]** 4 кандидата повторно тестировали в зависимости доза-эффект в анализе клеточной адгезии для определения значений IC50. В результате этого скрининга, был идентифицирован NB0627 в качестве особо подходящего (Таблица 2).

Таблица 2. Значения IC50 для основных 4 перекрестно-реагирующих связующих /блокаторов, идентифицированных в Таблице 1.				
IC50 (нМ)	NB0625	NB0627	NB0639	NB0794
HuPOSTN	243,3	22,4	236,8	73,1

- 10 **[0087]** Затем NB0627 превращали в эффекторный молчаливый IgG4PAA изотип, создавая основной кандидат NB0828. При секвенировании NB0828 было идентифицировано подверженность двум постраницсионным модификациям в VH области. Первая, сайт дезамидирования, расположенная в CDR-H2, и вторая, сайт окисления, расположенная в CDR-H3. Таким образом, при попытке
- 15 удаления этих подверженностей, было создано несколько единичных и двойных

мутантов и измеряли их связывание и активность. Обобщенные результаты для значений IC50 и EC50 для NB0828 и их вариантов перечислены в **Таблице 3**.

Таблица 3. Обобщенные данные связывания и функциональные данные для NB0828 и вариантов NB0828.					
Анализ	POSTN Форма	NB0828	NB1003 (N55S)	NB1010 (N55Q)	NB1011 (N55T)
САА IC50 (нМ)	Человек	24,34	10,75	7,97	15,03
	Мышь	25,97	14,91	19,60	22,31
EC50 связывания (нМ)	Человек	0,12	0,08	0,08	0,07
	Мышь	0,15	0,08	0,10	0,07
Анализ	POSTN Форма	NB1015 (N55D)	NB1012 (N55S_M100I)	NB1014 (N55T_M100V)	
САА IC50 (нМ)	Человек	13,63	н.н.	н.н.	
	Мышь	20,91	42,34	65,08	
EC50 связывания (нМ)	Человек	0,12	2,28	9,47	
	Мышь	0,18	4,42	19,27	
Следует отметить, что н.н. означает, что при анализе не наблюдали насыщения.					

Примет 3- Эффективность *in vivo* NB0828 на мышинных моделях опухоли мочевого пузыря MB49 и ободочной кишки CT26

5 **[0088]** Эффективность NB0828 тестировали на двух отдельных мышинных моделях, моделях опухоли мочевого пузыря MB49 и ободочной кишки CT26. Вкратце, 250000 MB49 клеток инъецировали внутрикожно в бок самкам C57BL/6 мышей, или 50000 CT26 клеток инъецировали внутрикожно в бок самкам Balb/c

10 мышей. Через 3 дня после трансплантации опухоли, мышей лечили внутрибрюшинно либо с помощью NB0828 (50 мг/кг, 3QW) или контрольного наполнителя (PBS). Объем опухоли оценивали два раза в неделю путем измерения штангенциркулем и рассчитывали в виде $(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$.

15 Мышей подвергали эвтаназии, когда размер опухоли превышал 15 мм в любом одном направлении или из-за изъязвления опухоли в качестве гуманной конечной точки.

[0089] Как показано на **Фиг. 2** и **Фиг. 5**, NB0828 оказывает влияние на уменьшение роста опухоли в обеих моделях. На модели MB49 это уменьшение роста опухоли было ассоциировано со более низким % внутриопухолевых гранулоцитных миелоидных клеток, как показано на **Фиг. 3**, и более низким содержанием коллагена, как показано на **Фиг. 4**. Как и на MB49 модели, CT26 модель продемонстрировала уменьшение гранулоцитных миелоидных клеток. Дополнительно, NB0828 уменьшило частоту макрофагов, инфильтрирующих опухоль, и присутствующие макрофаги были смещены в сторону M1 фенотипа в результате NB0828 лечения, как показано на **Фиг. 6**. На мышинной модели CT26, NB0828 лечение также связано с более высоким количеством CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, инфильтрирующих опухоль, и существенно более высокой секрецией гамма-интерферона в Т-клетках, инфильтрирующих опухоль, как показано на **Фиг. 7**.

Имунофенотипирование

[0090] Мышей, несущих MB49 или CT26 опухоль, лечили с применением NB0828 или контрольного наполнителя, начиная с дня 3, как описано. Для представленных данных, иммунофенотипирование осуществляли в день 20 и день 18 после трансплантации опухоли для MB49 и CT26, соответственно. Опухоли иссекали, удаляли кожу, и механически разрушали, используя лезвие скальпеля, затем ферментативно расщепляли, используя смесь ферментов для диссоциации опухоли мыши Miltenyi (Miltenyi Biotec, № CAT 130-110-187). Расщепленные образцы пропускали через 40 мкм сито, промывали в RPMI, затем второй раз промывали в RPMI + 10% FBS. После этого клетки ресуспендировали для подсчета и максимально 2×10^6 лейкоцитов на образец высевали на планшет и окрашивали для анализа путем проточной цитометрии. Для оценки функции CD8⁺ лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, на модели CT26, расщепленных одноклеточных суспензий из опухолей стимулировали с помощью AN1 пептида [H2-L^d рестриктированный gp70 (423-431) MuLV эпитоп, иммунодоминантный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, экспрессируемый CT26 клетками] в присутствии анти-CD28 и Брефелдин А в течение 5 часов при 37°C. После стимуляции, клетки окрашивали для обнаружения продукции IFN-γ с помощью CD8⁺ Т-клеток, используя проточную цитометрию с помощью методов стандартного поверхностного /внутриклеточного окрашивания. Представленные панели проточного окрашивания, используемые для оценки клеточной популяции,

включены ниже в Таблице 4. Жизнеспособный штамм (Thermo Fisher, Live/Dead Fixable Violet Stain) использовали для предоставления возможности опроса только живых клеточных событий и панлейкоцитарный маркер CD45 включали для предоставления возможности нормализации популяций в пределах

5 иммунного компартмента. Представляющие интерес иммунные популяции определяли фенотипично / функционально следующим образом: Общие миелоидные клетки (CD45+ CD11b+), гранулоциты (CD45+ CD11b+ Gr-1 hi или CD45+ CD11b+ Ly6G+ Ly6C lo), макрофаги (CD45+ CD11b+ Ly6G- Ly6C lo/neg F4/80+), M1 Макрофаги (MHC II+ CD206-), M2 Макрофаги (MHC II- CD206+), CD8+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD90,2+ CD8+), CD4+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD90,2+ CD4+), IFN- γ + CD8+ TIL (CD45+ CD11b- CD3+ CD8+ IFN- γ +).

10 Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) использовали для определения IFN- γ интенсивности окрашивания из IFN- γ + CD8+ TIL.

Таблица 4. Коктейли антител, используемые для оценки фенотипа/ функции иммунных клеток в MB49 и CT26 опухолях				
Панель окрашивания MB49				
MHC II – AF488	iNOS-PE	CD11b-PerCP-Cy5,5	PD-1-PE-Cy7	Arginase-1-APC
Gr-1-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	F4/80 BV510	CD206 BV650
Панель окрашивания CT26– TIL Анализ				
CD3-AF488	PDGFR- α -PE	CD8a-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	AH-1 Tetramer-APC
CD90.2-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
Панель окрашивания CT26 – TIL Функция				
CD3-AF488	IFN- γ -PE	CD8a-PerCP-Cy5.5	PD-1-PE-Cy7	IL-2-AF647
TNF-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD4-BV510	CD11b-BV650
Панель окрашивания CT26 – Миелоидные клетки				
MHC II – AF488	PD-L1-PE	CD11b-PerCP-Cy5.5	Ly6C-PE-Cy7	F4/80-AF647
Ly6G-AF700	CD45-APC-Fire-750	Live/Dead Violet	CD40 BV510	CD206 BV650

Содержание коллагена

[0091] Общее содержание коллагена опухолей оценивали путем количественного определения гидроксипролина, используя QuickZyme[®] анализ общего коллагена (QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands, номер по каталогу: QZVtotcoll). Для приготовления образца, MB49 опухоли иссекали из мышей, несущих опухоль, когда опухоли достигали конечной точки, и мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C перед анализом. Опухолевый материал взвешивали и ресуспендировали в 6М HCl при 200 мг опухоли / мл HCl, перемешивали вихревым способом и инкубировали при 95°C в течение 20 часов. Пробирки охлаждали, центрифугировали при 13 тыс. об./мин. в течение 10 минут, и супернатант собирали. Супернатанты разводили в Milli Q воде, затем в 4М HCl в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, и высевали в техничных двух повторах для обнаружения гидроксипролина, используя поставляемые буферы и реагенты для обнаружения. Измеряли значения ОП 570 нм и сравнивали со стандартной кривой, созданной, используя поставляемый коллаген, для расчета количества коллагена в каждом образце. Рассчитанный общий коллаген (мкг) для каждого образца разделяли на общую массу введенной опухоли (мг) для нормализования данных по всем опухолевым образцам.

Пример 4-Эффективность *in vivo* для NB0828 на модели опухоли ободочной кишки MC38 у мышей

[0092] NB0828 тестировали для определения его эффективности относительно уменьшения роста опухоли на модели опухоли ободочной кишки MC38 у мышей и результаты представлены на **Фиг. 8**. NB0828 также является эффективным относительно изменения микроокружения опухоли путем повышения CD8+ Т клеток, снижения частоты ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) и повышения соотношения провоспалительных макрофагов 1 типа, как показано на **Фиг. 9А** и **9С**. Эти изменения отвечают за эффективность NB0828 на этой модели, так как истощение CD8+ Т клеток во время NB0828 лечения реверсирует благоприятный эффект NB0828, как показано на **9D**. В целом, эти данные указывают на то, что NB0828 предоставляет возможность повышения CD8+ Т клеток в опухолевых сайтах, снижения TAM и увеличения провоспалительного M1 макрофагового фенотипа в инфильтрированных опухолях.

Пример 5- Эффективность *in vivo* для NB0828 и анти-PD-1 антитела на модели опухоли ободочной кишки MC38 у мышей

[0093] NB0828 тестировали для определения его эффективности относительно уменьшения роста опухоли на модели опухоли ободочной кишки MC38 у мышей при введении в комбинации антителом, блокирующим функцию PD-1 антитело. ФИГ. 10А - С продемонстрировали, что, по сравнению с анти-PD-1 отдельно, комбинация анти-PD-1 и NB0828 дополнительно уменьшает рост опухоли (10А) и повышает общее выживание (10В полный ответ (CR) 16/43 по сравнению с 8/42)). Выжившие мыши, которые проявили полный ответ на лечение с применением комбинации NB0828 и анти-PD-1, были защищены от повторного заражения с применением 10х MC38 опухолевых клеток, указывая на то, что выжившие мыши приобрели иммунологическую память на опухоль.

[0094] Если мышей с установленными MC38 опухолями, которые были резистентны к лечению только и применением анти-PD-1, лечили с применением комбинации анти-PD-1 и NB0828, то резистентность устранялась, как показано на Фиг. 11. Как показано на Фиг. 12, комбинация NB0828 и анти-PD-1 увеличивала инфильтрацию и функцию CD8+ Т клеток (Фиг 12А и 12В), уменьшала накопление TAM (Фиг 12С) и увеличивала соотношение провоспалительного фенотипа оставшихся макрофагов в опухоли (Фиг 12D). Эти модификации в опухолевом микроокружении согласуются с тем, что NB0828 преодолевает резистентность к PD-1 путем улучшения CD8 Т-клеточной иммунной реакции и уменьшения иммуносупрессивных макрофагов.

[0095] Несмотря на то, что представлены и описаны в настоящей заявке предпочтительные варианты осуществления изобретения, для квалифицированных специалистов в данной области техники будет понятно, что такие варианты изобретения представлены только в качестве примера. Квалифицированными специалистами в данной области техники сейчас могут быть осуществлены различные вариации, изменения и замены без отклонения от сущности изобретения. Следует принять во внимание, что при практической реализации изобретения могут осуществлять различные альтернативы для вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке.

[0096] Все публикации, патентные заявки, выданные патенты и другие документы, на которые приведены ссылки в настоящей заявке, включены в данной описание путем ссылки, как если бы каждая индивидуальная публикация,

патентная заявка, выданный патент или другой документ быть специфически и индивидуально указан как включенный полностью путем ссылки. Определения, которые содержатся в тексте, включенном путем ссылки, исключены до той степени, в которой они противоречат определениям в настоящей заявке.

Перечни последовательностей, раскрытых в настоящей заявке		
SEQ ID NO:	Последовательность	Источник
13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY GISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQK LQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARDMLVVPFDYWGQGTLVTVSS	
14	QSVLTQSSSASGTPGQTVTVSCSGSSSDIGSNRV NWYQQLPGTAPKLLIYSNDQRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLQSADEADYYCAA WDDSLSTYV FGSGTKVTVL	
19	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSA MSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR HSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKLSLSLG	Эзабенлимаб (№ CAS 2249882-54-8) HC
20	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGIS FMNWIYQQKPGQAPKLLIYVASNQGGIPARFSG SGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC	Эзабенлимаб (№ CAS 2249882-54-8) LC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения особи, которая имеет злокачественное новообразование,
который включает введение особи (а) ингибитора PD-1 оси; и (б) ингибитора
5 периостина.
2. Способ по пункту 1, где ингибитор периостина включает антитело или его
антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином.
- 10 3. Способ по пункту 2, где ингибитор периостина включает антитело или его
антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, где
антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с
периостином, содержит:
 - а) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-H1), содержащую
15 аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 1
(GYTFTSYG);
 - б) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-H2), содержащую
аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID
NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT), или
20 6 (ISAYDGNT);
 - в) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-H3), содержащую
аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID
NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY), или 9 (DMLVVPFDY);
 - г) легкую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-L1), содержащую
25 аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10
(SSDIGSNR);
 - д) легкую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-L2) амина, содержащую
аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 11
(SND); и
 - 30 е) легкую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-L3), содержащую
аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12
(AAWDDSLSTYV).

4. Способ по пункту 3, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, является химерным или гуманизированным.
5. Способ по пункту 3 или 4, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой IgG антитело.
6. Способ по пункту 3 или 4, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).
7. Способ по одному из пунктов 3 - 6, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина:
- а) где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13; и
- б) где переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под номером 55 в SEQ ID NO: 13 представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин.
8. Способ лечения особи, которая имеет злокачественное новообразование, который включает введение особи (а) ингибитора PD-1 оси; и (б) ингибитора периостина.

9. Способ по пункту 8, где ингибитор периостина включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином.
10. Способ по пункту 9, где ингибитор периостина включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область легкой цепи иммуноглобулина:
- а) где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13; и
- б) где переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под номером 55 в SEQ ID NO 13: представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин.
11. Способ по пункту 10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, является химерным или гуманизированным.
12. Способ по пункту 10 или 11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой IgG антитело.
13. Способ по пункту 10 или 11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

14. Способ по одному из пунктов 3 - 13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, имеет IC50 меньше чем приблизительно 50 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей.
15. Способ по одному из пунктов 1 - 14, где ингибитор PD-1 оси представляет собой ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1.
16. Способ по пункту 15, где ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1.
17. Способ по пункту 15, где антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO.:19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO.:20.
18. Способ по пункту 15, где антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1, содержит пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, , тислелизумаб, спартализумаб, AMP-514 (MEDI0680), или эзабенлимаб, или его PD-1 связывающий фрагмент.
19. Способ по пункту 15, где ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2.
20. Способ по пункту 9, где антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2, включает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 (MDX-1105), AMP-224, цемиплимаб (REGN2810), торипалимаб (JS001-PD-1), камрелизумаб (SHR-1210), достарлимаб (TSR-042), цетрелимаб (JNJ-63723283), или FAZ053, или его PD-1 или PDL-2 связывающий фрагмент.

21. Способ по пункту 15, где ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает Fc-слитый белок, который связывается с PD-1, PDL-1 или PDL-2.
- 5 22. Способ по пункту 21, где Fc-слитый белок включает AMP-224 или его PD-1 связывающий фрагмент.
23. Способ по пункту 8, где ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.
- 10 24. Способ по пункту 23, где низкомолекулярный ингибитор пути передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 включает один или несколько:
 N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил}метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-
 15 (2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серин гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-
 20 2-ил)-1-фенил-1h-индол; L- α -Глутамин, N₂,N₆-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил;
 25 (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; Глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический (1 \rightarrow 14)-тиоэфир; или его производное или аналог.
- 30 25. Способ по одному из пунктов 1 - 24, где у особи развилось прогрессирующее заболевание после лечения с применением ингибитора контрольных точек в качестве монотерапии.

26. Способ по пункту 25, где ингибитор контрольных точек включает ингибитор PD-1 доступа.
27. Способ по одному из пунктов 1 - 26, где ингибитор PD-1 оси и ингибитор периостина вводятся отдельно.
28. Способ по одному из пунктов 1 - 27, где ингибитор PD-1 оси и ингибитор периостина вводятся в тот же день.
29. Способ по одному из пунктов 1 - 27, где ингибитор PD-1 оси и ингибитор периостина вводятся в различные дни.
30. Способ по одному из пунктов 1 - 29, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.
31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, для применения у пациента, также подвергаемого лечению ингибитором PD-1 оси.
32. Применение по пункту 31, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, содержит:
- а) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 1 (GYTFTSYG);
 - б) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-H2), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 2 (ISAYNGNT), 3 (ISAYSGNT), 4 (ISAYQGNT), 5 (ISAYTGNT), или 6 (ISAYDGNT);
 - в) тяжелую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в одном из SEQ ID NO: 7 (DILVVPFDY), 8 (DVLVVPFDY), или 9 (DMLVVPFDY);

- г) легкую цепь иммуноглобулина CDR1 (CDR-L1), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 (SSDIGSNR);
- д) легкую цепь иммуноглобулина CDR2 (CDR-L2) аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 11 (SND); и
- е) легкую цепь иммуноглобулина CDR3 (CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12 (AAWDDSLSTYV).

10

33. Применение по пункту 31, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, является химерным или гуманизированным.

15 34. Применение по одному из пунктов 31 - 33, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой IgG антитело.

20 35. Применение по одному из пунктов 31 - 33, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

25 36. Применение по одному из пунктов 31 - 35, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, включает тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина:

- а) где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в 13; и
- б) где переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под

30

номером 55 в SEQ ID NO: 13 представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин.

5

37. Рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, для применения у пациента, также подвергнутого лечению ингибитором PD-1 оси, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, включает тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина:

10

а) где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13; и

15

б) где переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 99%, или 100% идентична последовательности, как указано в SEQ ID NO: 14, где аспарагин под номером 55 в SEQ ID NO 13: представляет собой аспарагин, серин, глутамин, треонин или аспарагиновую кислоту, и где метионин под номером 100 в SEQ ID NO: 13 представляет собой метионин, изолейцин или валин.

20

38. Применение по пункту 37, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, является химерным или гуманизированным.

25

39. Применение по пункту 37 или 38, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, представляет собой IgG антитело.

30

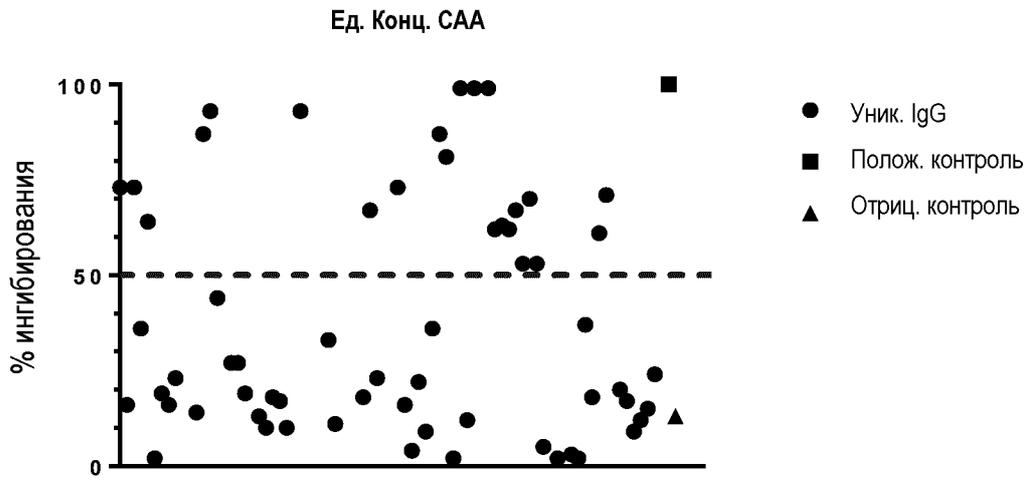
40. Применение по пункту 37 или 38, где рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином,

представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

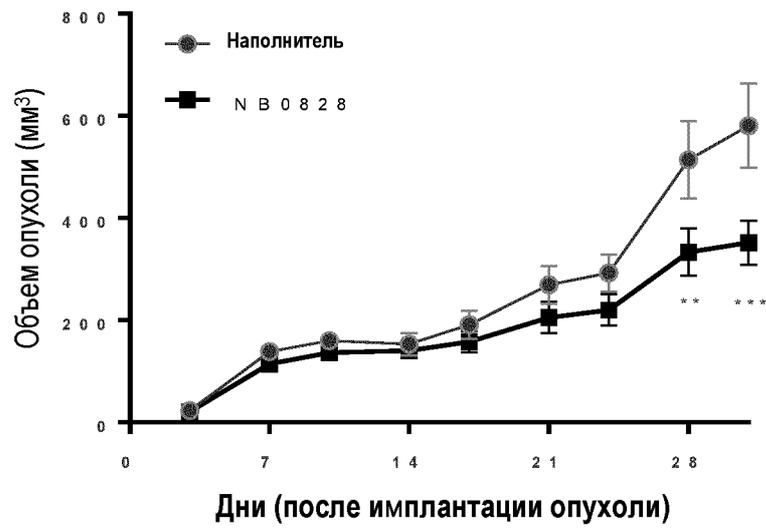
41. Применение по одному из пунктов 31 - 40, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) связывается с периостином, имеет IC₅₀ меньше чем приблизительно 50 наномоль в анализе адгезии клеток, осуществленном с клетками фибробластов легких человека и/или клетками фибробластов мышей.
42. Применение по одному из пунктов 31 - 41, где ингибитор PD-1 оси представляет собой ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов.
43. Применение по пункту 42, где ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывается с PD-1.
44. Применение по пункту 42, где антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO.:19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO.:20.
45. Применение по пункту 42, где антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1, включает пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, , тислелизумаб, спартализумаб, AMP-514 (MEDI0680), или эзабенлимаб, или его PD-1 связывающий фрагмент.
46. Применение по пункту 42, где ингибитор PD-1 оси представляет собой антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2.
47. Применение по пункту 46, где антитело, которое специфически связывается с PDL-1 или PDL-2, включает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 (MDX-1105), AMP-224, цемиплимаб (REGN2810), торипалимаб (JS001-PD-1), камрелизумаб (SHR-1210), достарлимаб (TSR-042), цетрелимаб (JNJ-63723283), или его PD-1 или PDL-2 связывающий фрагмент.

48. Применение по одному из пунктов 31 - 41, где ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает Fc-слитый белок, который связывается с PD-1, PDL-1 или PDL-2.
- 5 49. Применение по пункту 48, где Fc-слитый белок включает AMP-224 или его PD-1 связывающий фрагмент.
50. Применение по пункту 42, где ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2 передачи сигналов включает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.
- 10 51. Применение по пункту 50, где низкомолекулярный ингибитор пути передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 включает один или несколько:
- N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил}метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-
 15 (2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серин гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-
 20 2-ил)-1-фенил-1h-индол; L- α -Глутамин, N₂,N₆-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил;
 25 (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; Глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический (1 \rightarrow 14)-тиоэфир; или его производное или аналог.
- 30 52. Применение по одному из пунктов 31 - 51, где особь имеет злокачественное новообразование.

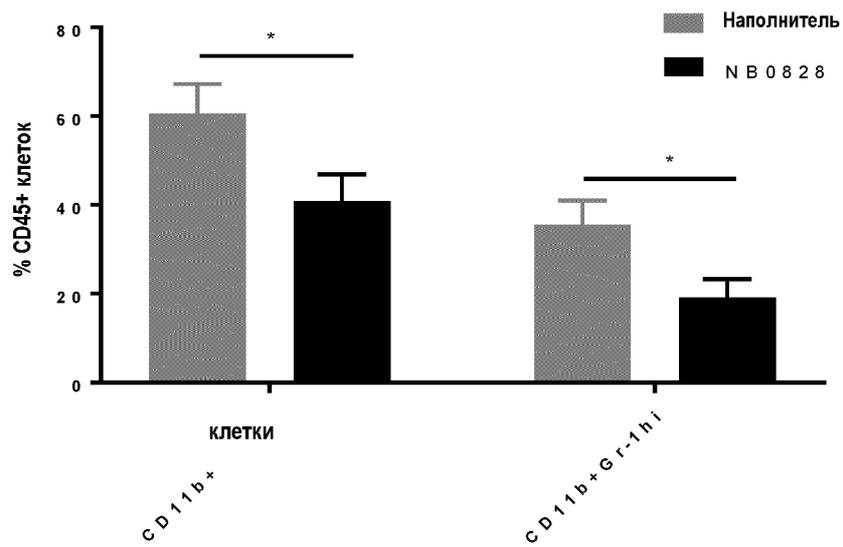
53. Применение по пункту 52, где злокачественное новообразование включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак головы и шеи, рак яичников, рак ободочной кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы или рак легких.



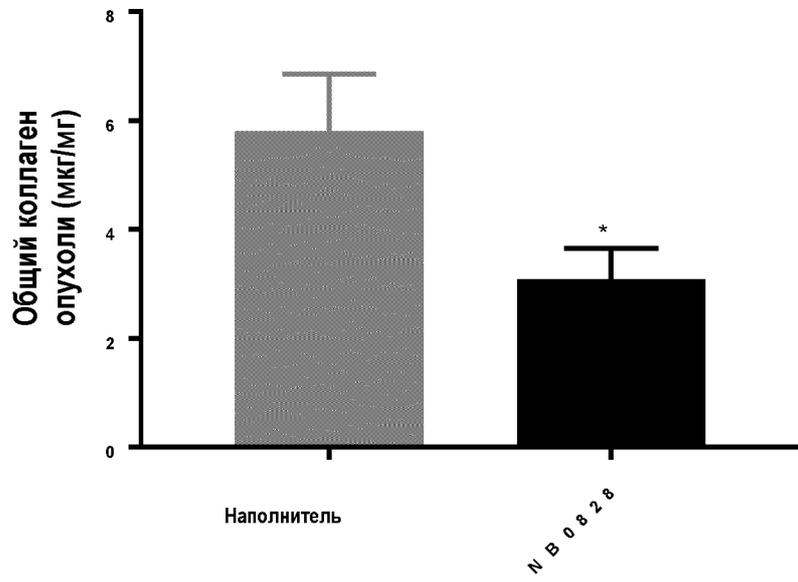
ФИГ. 1



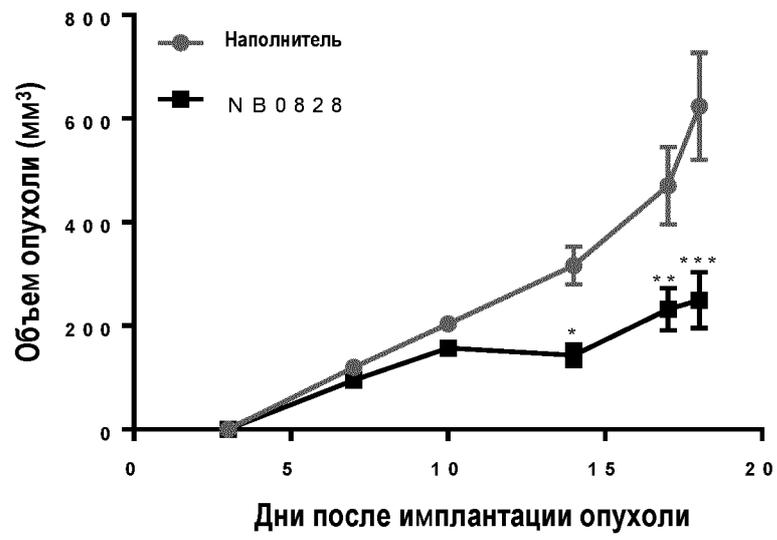
ФИГ. 2



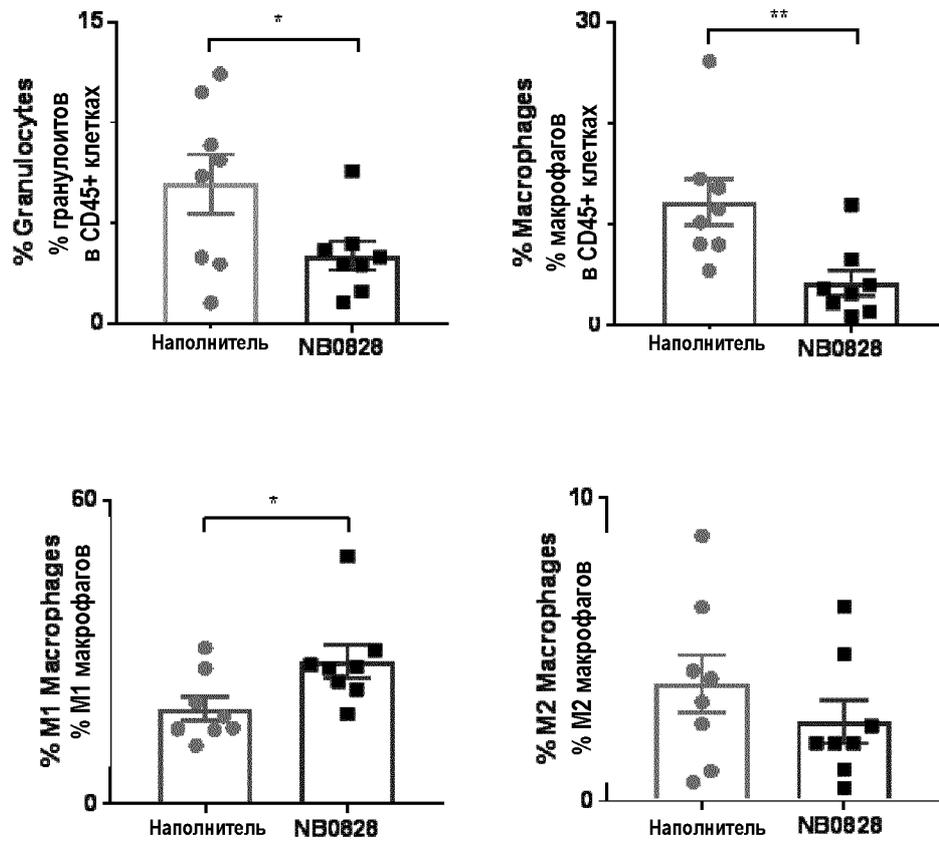
ФИГ. 3



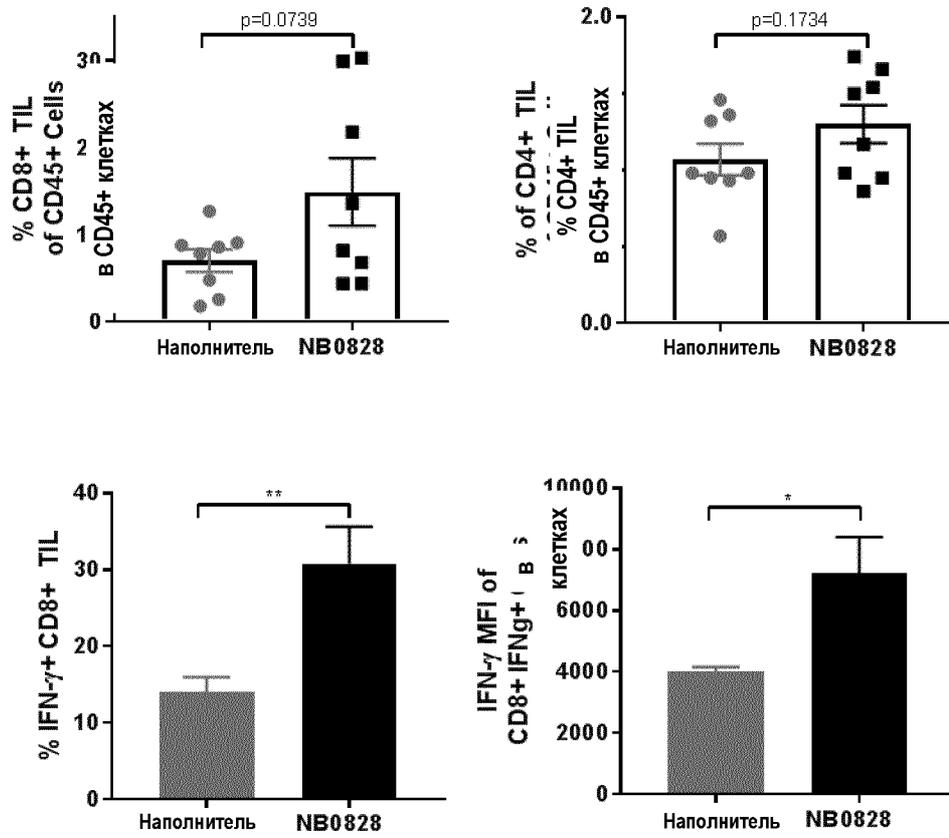
ФИГ. 4



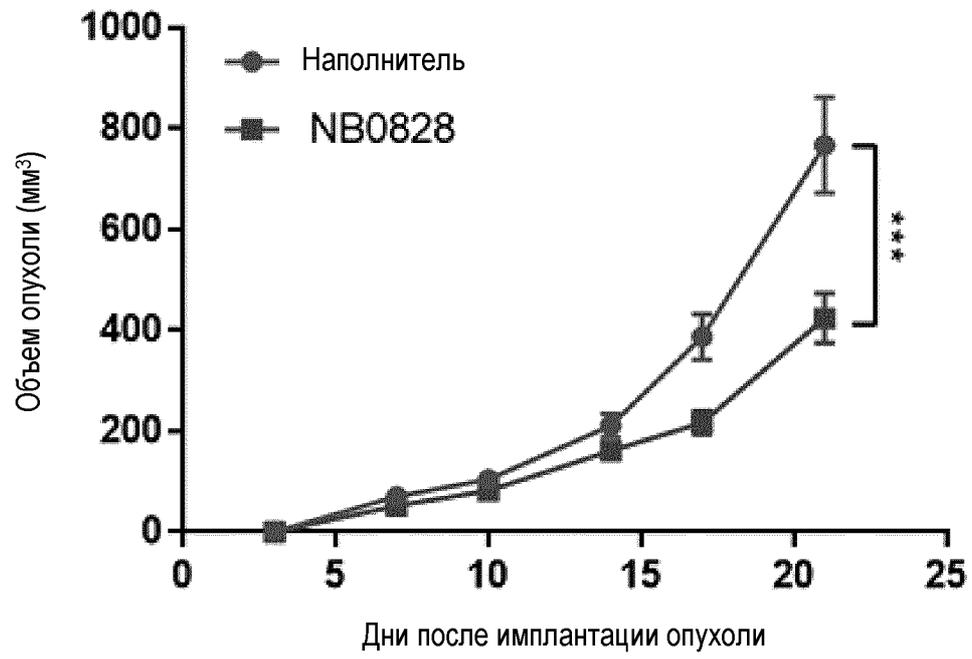
ФИГ. 5



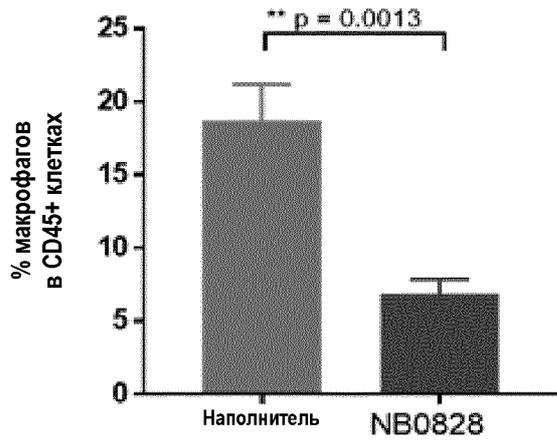
ФИГ. 6



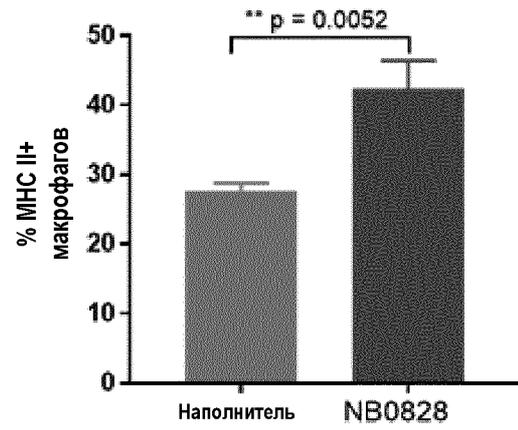
ФИГ. 7



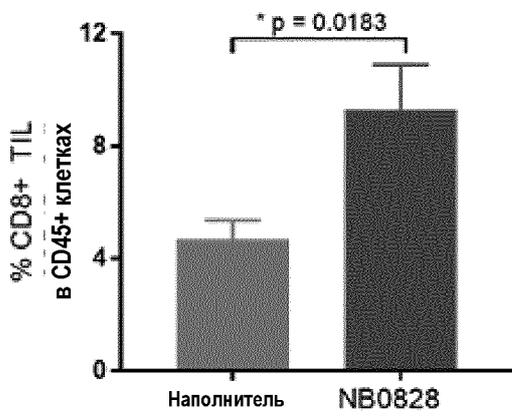
ФИГ. 8



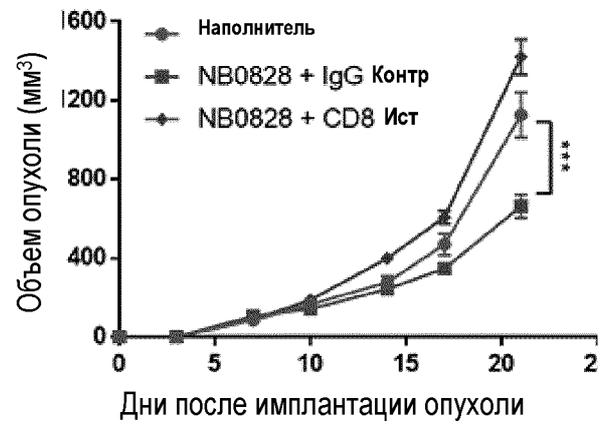
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



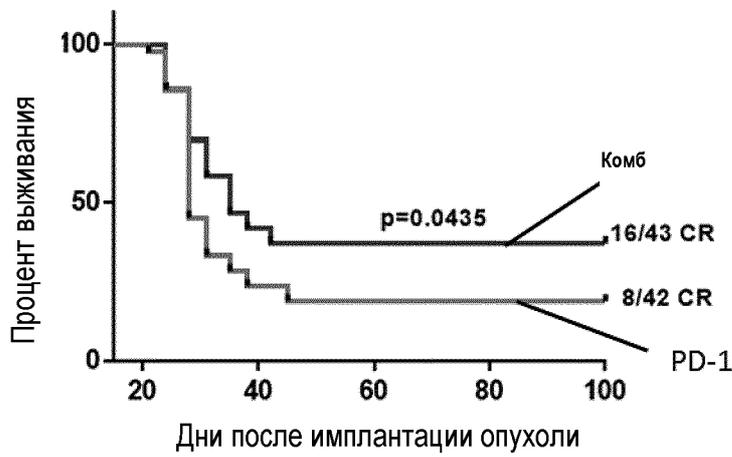
ФИГ. 9С



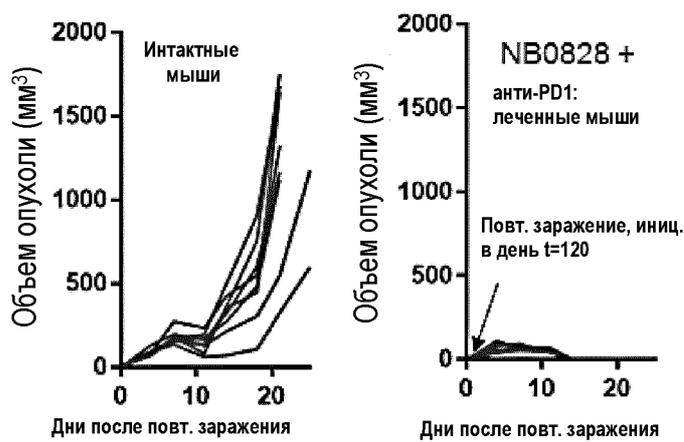
ФИГ. 9Д



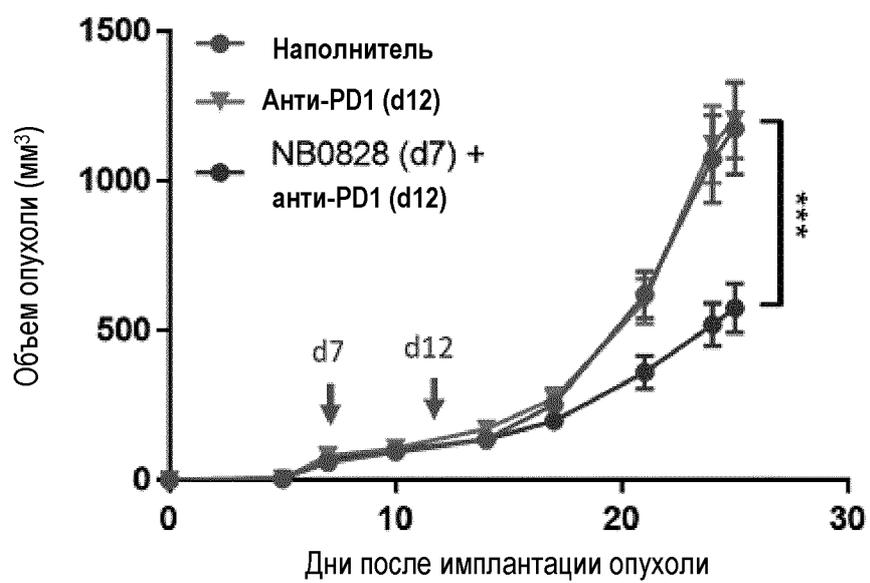
ФИГ. 10А



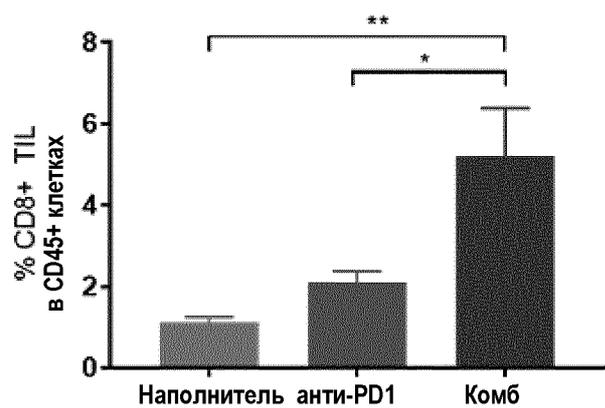
ФИГ. 10В



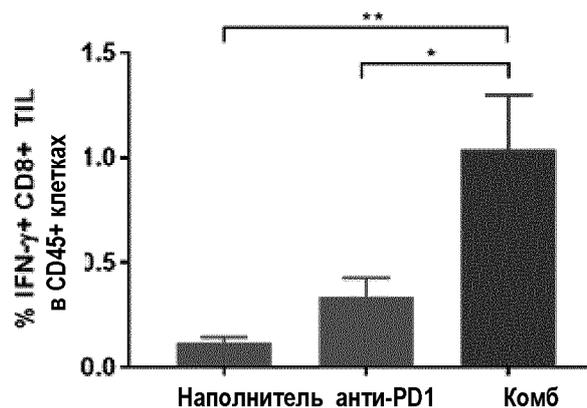
ФИГ. 10С



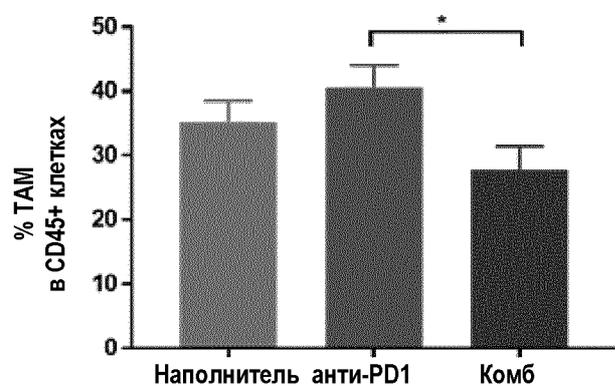
ФИГ. 11



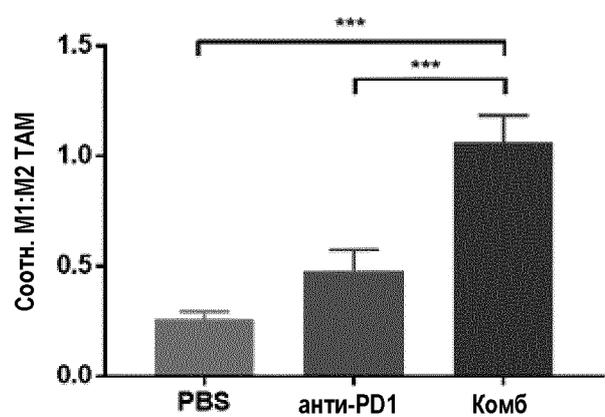
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В



ФИГ. 12С



ФИГ. 12D