

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392809 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.05(22) Дата подачи заявки
2022.04.12(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, НАЦЕЛИВАЮЩЕЕСЯ НА PD-1 И TIM-3

(31) 63/174,156

(32) 2021.04.13

(33) US

(86) PCT/US2022/024368

(87) WO 2022/221245 2022.10.20

(71) Заявитель:
МЕДИМБЬОН, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:

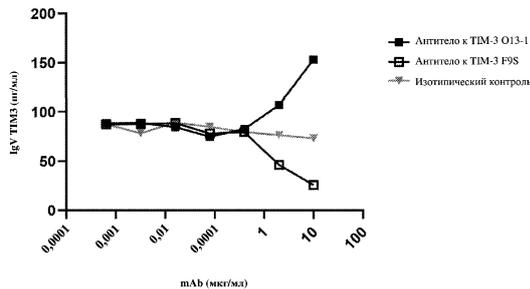
Полицици Кристен, Хэммонд Скот А.,
Мэйзор Ярив, Перри Тринити,
Притс Стейси, Джайсвал Ашвин Р.,
Оганесян Вахе, Ян Чаннинг (US),
Курек Раффаэль (GB), Чайковская
Наталья, Ферте Чарльз, Клэнси-
Томпсон Элеанор (US)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены способы изменения контактного взаимодействия между белком-3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), и фосфатидилсерином (PS) у субъекта. Также представлены способы лечения с использованием TIM-3-связывающего белка, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'С" и DE в варибельном домене иммуноглобулина (IgV) TIM-3.

ELISA для определения взаимодействия TIM-3/фосфатидилсерин



A1

202392809

202392809

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, НАЦЕЛИВАЮЩЕЕСЯ НА PD-1 И ТИМ-3

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение в целом относится к механизмам действия и способам лечения с использованием белка, связывающего белок-3, содержащий домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТИМ-3), где ТИМ-3-связывающая область специфически связывается с вариабельным доменом иммуноглобулина (IgV) ТИМ-3.

2. ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Рак по-прежнему остается основной глобальной проблемой здравоохранения. Несмотря на прогресс в иммуноонкологии, по-прежнему существует неудовлетворенная медицинская потребность в эффективных видах терапии, особенно для пациентов с приобретенной резистентностью к средству иммуноонкологии (ИО).

[0003] Был идентифицирован целый ряд молекулярных мишеней с точки зрения их потенциальной применимости в качестве ИО терапевтических препаратов против рака. Некоторые молекулярные мишени, которые исследуются с точки зрения их терапевтического потенциала в области иммуноонкологической терапии, включают антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4 или CD152), лиганд-1 запрограммированной гибели клетки (PD-L1, или B7-H1, или CD274), белок-1 запрограммированной гибели (PD-1), OX40 (CD134 или TNFRSF4) и Т-клеточный ингибиторный рецептор, белок 3, содержащий домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТИМ3). Однако не все пациенты отвечают на иммунную терапию, а некоторые пациенты перестают отвечать со временем. Для исследователей причины такой приобретенной резистентности к ИО остаются неясными.

[0004] Таким образом, остается потребность в идентификации мишеней-кандидатов для видов иммунотерапии, в частности, видов иммунотерапии, которые преодолевают приобретенную резистентность к ИО и усиливают ответ у пациентов по сравнению с текущими прошедшими клиническую оценку стратегиями иммунотерапии.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном документе представлены способы изменения контактного взаимодействия между белком-3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (ТИМ-3), и фосфатидилсерин (PS) у субъекта, при этом способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, где ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE вариабельного домена иммуноглобулина (IgV) ТИМ-3. В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает противоопухолевую активность у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела. В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего

белка увеличивает противоопухолевую активность у субъекта по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

[0006] В данном документе также представлены способы увеличения опосредованной Т-клетками противоопухолевой активности у субъекта, при этом способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, где ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене ТИМ-3. В некоторых аспектах опосредованная Т-клетками противоопухолевая активность у субъекта увеличивается по сравнению с отсутствием введения антитела. В некоторых аспектах опосредованная Т-клетками противоопухолевая активность у субъекта увеличивается по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

[0007] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает фагоцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела. В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает фагоцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта относительно введения ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

[0008] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает перекрестную презентацию опухолевого антигена дендритными клетками у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела. В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает перекрестную презентацию опухолевого антигена дендритными клетками у субъекта относительно введения ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

[0009] В данном документе также представлены способы стимулирования фагоцитоза опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта, при этом способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, где ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене ТИМ-3.

[0010] В данном документе также представлены способы увеличения перекрестной презентации опухолевых антигенов дендритными клетками у субъекта, при этом способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-

связывающий домен, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене TIM-3. В некоторых аспектах уровень перекрестной презентации дендритными клетками увеличивается по сравнению с отсутствием введения антитела. В некоторых аспектах уровень перекрестной презентации дендритными клетками у субъекта увеличивается по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене TIM-3.

[0011] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, введение TIM-3-связывающего белка увеличивает секрецию IL-2 при контактном взаимодействии с TIM-3-положительными Т-клетками у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела. В некоторых аспектах введение TIM-3-связывающего белка увеличивает секрецию IL-2 при контактном взаимодействии с TIM-3-положительными Т-клетками у субъекта по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене TIM-3.

[0012] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, введение TIM-3-связывающего белка приводит к подавлению роста опухоли у субъекта. В некоторых аспектах опухоль представляет собой распространенную или метастатическую солидную опухоль. В некоторых аспектах у субъекта имеется одно или несколько из рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака пищевода, рака желудка, опухолей желчных путей, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза.

[0013] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, у субъекта имеется приобретенная резистентность к средству иммуноонкологии (ИО).

[0014] В данном документе также представлены способы лечения рака у субъекта с приобретенной резистентностью к ИО, где способ включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене TIM-3. В некоторых аспектах рак представляет собой одно или несколько из рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака пищевода, рака желудка, опухолей желчных путей, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза. В некоторых

аспектах субъектом является человек. В некоторых аспектах у субъекта была документирована стадия III, которая не поддается излечивающему оперативному вмешательству или лучевой терапии, или стадия IV немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). В некоторых аспектах NSCLC представляет собой плоскоклеточную или неплоскоклеточную NSCLC. В некоторых аспектах у субъекта имеется радиологически документированное прогрессирование опухоли или клиническое ухудшение после первоначального лечения с помощью средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение минимум 3-6 месяцев, в качестве монотерапии или в комбинации с химиотерапией, и имелись признаки начальной клинической пользы, т. е. стабилизация или регресс заболевания.

[0015] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, приобретенная резистентность к Ю определяется как: (i) воздействие средства монотерапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение менее 6 месяцев с первоначальным наилучшим общим ответом (BOR) в виде частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1; или (ii) воздействие средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, отдельно или в комбинации с химиотерапией в течение 6 месяцев или больше с BOR в виде стабилизации заболевания, частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания в через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1.

[0016] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, приобретенная резистентность к Ю определяется как воздействие средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение 6 месяцев или больше, отдельно или в комбинации с химиотерапией; с наилучшим общим ответом (BOR) в виде стабилизации заболевания, частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1. В некоторых аспектах у субъекта балл пропорции опухоли (TPS) по PD-L1 составляет 1% или больше. В некоторых аспектах пациент не получал предшествующую системную терапию в качестве терапии первой линии. В некоторых аспектах предшествующая системная терапия представляет собой средство терапии Ю, отличное от средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1. В некоторых аспектах субъект получал предшествующую нео/адьювантную терапию, но у него отсутствовало прогрессирование в течение по меньшей мере 12 месяцев после

последнего введения средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1. В некоторых аспектах у субъекта TPS по PD-L1 составляет 50% или больше.

[0017] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе TIM-3-связывающий белок содержит определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 9 соответственно или SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 13 соответственно.

[0018] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, TIM-3-связывающий домен специфически связывается с эпитопами на IgV-домене TIM-3, и эпитопы содержат N12, L47, R52, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71, T75 и E77 из TIM-3 (SEQ ID NO: 29).

[0019] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, TIM-3-связывающий белок дополнительно содержит домен связывания белка-1 запрограммированной гибели клетки (PD-1). В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен содержит первый набор определяющих комплементарность областей (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 9 или 1, 2, 3, 7, 8 и 13 соответственно; и связывающий домен для PD-1 содержит второй набор CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11 и 12 соответственно.

[0020] В некоторых аспектах TIM-3-связывающий белок содержит вариабельный домен первой тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, вариабельный домен первой легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, VH второй тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, и VL второй легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и

вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

[0021] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, ТИМ-3-связывающий белок содержит агликозилированную Fc-область. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий белок содержит дегликозилированную Fc-область. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий белок содержит Fc-область, которая характеризуется сниженным фукозилированием или является афукозилированной.

[0022] В настоящем документе также раскрыты способы лечения NSCLC у субъекта, имеющего распространенную или метастатическую NSCLC, при этом способ включает введение субъекту биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и ТИМ-3-связывающий домен, где биспецифический связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и где у субъекта имеется приобретенная резистентность к IO.

[0023] В данном документе также раскрыты способы подавления роста немелкоклеточной опухоли легкого у субъекта, имеющего распространенную или метастатическую опухоль, при этом способ включает введение субъекту биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и ТИМ-3-связывающий домен, где биспецифический связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и где у субъекта имеется приобретенная резистентность к IO. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'С" и DE в IgV-домене ТИМ-3. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с

эпитопами на IgV-домене TIM-3, и эпитопы содержат N12, L47, R52, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71, T75 и E77 из TIM-3 (SEQ ID NO: 29).

[0024] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, NSCLC представляет собой плоскоклеточную или неплоскоклеточную NSCLC.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0025] На **фиг. 1A** показано, что моноклональное антитело (mAb) O13-1 (исходное mAb к TIM-3 для AZD7789) увеличивает связывание (h-)TIM-3 человека с фосфатидилсерином по сравнению с изотипическим контролем и по сравнению с mAb к TIM-3 (F9S), которое уменьшает взаимодействие h-TIM-3 с фосфатидилсерином (PS).

[0026] На **фиг. 1B** показано, что моновалентного контактного взаимодействия TIM-3 с AZD7789 достаточно для увеличения взаимодействия TIM-3 с фосфатидилсерином в сравнении со связыванием бивалентным mAb O13-1 и в сравнении с изотипическим контролем. Планки погрешностей представляют SEM.

[0027] На **фиг. 2** показано, что моноклональное антитело (mAb) O13-1 и mAb AZD7789 увеличивают связывание IgV TIM-3 человека с апоптотическими клетками в сравнении с антителом к PD-1 (LO115), mAb к TIM-3, блокирующим PS (F9S), Duet LO115/F9S и E2E, которые уменьшают взаимодействие h-TIM-3 с апоптотическими клетками.

[0028] На **фиг. 3** показано, что AZ-клоны антител к TIM3, 62GL и O13, опосредуют подобный эффект усиления продукции IL-2 Т-клетками Jurkat, экспрессирующими TIM3. Следовательно, различие по одной аминокислоте между 62GL и O13 не влияет на этот фенотип.

[0029] На **фиг. 4** показан зависимый от концентрации эффект mAb к TIM-3, O13-1, по запуску увеличения продукции IL-2 клетками Jurkat, экспрессирующими h-TIM-3, при стимуляции Т-клеток. Все другие оцениваемые mAb к TIM-3 продемонстрировали зависимое от концентрации снижение продукции IL-2. Планки погрешностей представляют SEM.

[0030] На **фиг. 5** показано, что наблюдаемое увеличение продукции IL-2 клетками Jurkat, экспрессирующими h-TIM-3, после стимуляции и добавления mAb к TIM-3, O13-1, полностью исчезает, если клетки культивируют при высокой концентрации mAb к TIM-3, F9S, которое блокирует взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсерином.

[0031] На **фиг. 6** показано, что введение TIM3 в Т-клетки Jurkat усиливает продукцию IL-2; при этом она дополнительно увеличивалась под действием AZ-антитела к TIM3 (клон O13) и снижалась под действием конкурентно-подобного антитела к TIM3 (F9S). Этот эффект лекарственного средства зависит от связывания TIM3 с

фосфатидилсерин, поскольку мутация остатка, критически важного для связывания (R111A), отменяет действие лекарственного средства, а также общую продукцию IL-2 Т-клетками Jurkat.

[0032] На **фиг. 7А** и **7В** показано, что AZD7789 и его исходное mAb к TIM-3, O13-1, усиливают секрецию IFN- γ у простимулированных первичных РВМС человека. На **фиг. 7А** показана секреция IFN- γ у простимулированных первичных РВМС человека при введении mAb в клетки одного донора. На **фиг. 7В** показана секреция IFN- γ у простимулированных первичных Т-клеток человека при введении mAb в клетки другого донора. Тестируемые антитела показаны в подписи под фигурой. Планки погрешностей представляют SEM для лунок в трех повторностях.

[0033] На **фиг. 8А** и **8В** показано, что AZD7789 может усиливать эффероцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками. На **фиг. 8А** показан эффероцитоз апоптотических клеток Jurkat дендритными клетками после введения тестируемых антител или без введения лекарственного средства в режиме реального времени (часы). На **фиг. 8В** показана кратность изменения эффероцитоза после введения тестируемых антител. Кратность изменения эффероцитоза определяли по сравнению с группой, не получавшей обработку лекарственными средствами. Планки погрешностей представляют SEM.

[0034] На **фиг. 9А** и **9В** показан процент пролиферации Т-клеток из первичных Т-клеток человека после совместного культивирования с дендритными клетками, которые были предварительно инкубированы с апоптотическими опухолевыми клетками в присутствии или отсутствии тестируемых антител. На **фиг. 9А** показан процент пролиферации MART-1-реактивных Т-клеток после совместного культивирования с дендритными клетками, которые были предварительно инкубированы с апоптотическими клетками Jurkat, экспрессирующими MART-1. На **фиг. 9В** показан процент пролиферации CMVpp65-реактивных Т-клеток после совместного культивирования с дендритными клетками, которые были инкубированы с апоптотическими клетками Jurkat, экспрессирующими CMVpp65.

[0035] На **фиг. 10А** и **10В** показано, что в гуманизированной мышинной модели с адоптивным переносом опухолевых реактивных Т-клеток человека AZD7789 улучшает контроль опухоли (**фиг. 10А**) и выживаемость (**фиг. 10В**) по сравнению с применением только антитела к PD-1.

[0036] На **фиг. 11А** и **11В** показано, что обработка с помощью AZD7789 приводит к уменьшению роста опухоли у гуманизированной мышинной модели *in vivo* по сравнению с обработкой с помощью только mAb к PD-1 или в комбинации с молекулой к TIM-3,

блокирующей фосфатидилсерин, в виде бивалентного mAb или в биспецифическом формате. На **фиг. 11А** показан объем опухоли после введения тестируемых антител в случае первого донора. На **фиг. 11В** показан объем опухоли после введения тестируемых антител в случае другого донора. Горизонтальные полоски представляют внутригрупповое среднеарифметическое значение объема опухоли.

[0037] На **фиг. 12А-12С** показано, что введение AZD7789 увеличивает секрецию IFN- γ у простимулированных *ex vivo* инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, взятых от мышей, у которых наблюдали прогрессирование на фоне обработки антителом к PD-1. На **фиг. 12А** представлена схема исследования, показывающая результат введения антител к PD-1 в отношении объема опухоли в гуманизированной мышинной модели и *ex vivo* стимуляцию иссеченной опухоли с помощью тестируемых лекарственных средств. На **фиг. 12В** показана кратность изменения секреции IFN- γ у простимулированных *ex vivo* инфильтрирующих опухоль лимфоцитов после добавления антитела к PD-1, LO115, и AZD7789 по сравнению с изотипическим контролем. На **фиг. 12С** показано увеличение секреции IFN- γ у простимулированных *ex vivo* инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, взятых у одной репрезентативной мыши, после добавления антитела к PD-1, LO115, и AZD7789 в сравнении с изотипическим контролем.

[0038] На **фиг. 13А** представлен график, показывающий кривые роста опухоли после обработки изотипическим контролем, AZD7789, только антителом к PD-1, LO115, и антителом к PD-1, а затем последовательной обработки AZD7789, у гуманизированных иммунодефицитных мышей, которым подкожно приживляли опухолевые клетки PC9-MART-1 человека.

[0039] На **фиг. 13В** и **13С** показано, что последовательная обработка с помощью AZD7789 после обработки антителом к PD-1 может задерживать рост опухоли у мышей по сравнению с непрерывной обработкой с помощью только антитела к PD-1. На **фиг. 13В** показано изменение объема опухоли после обработки изотипическим контролем, непрерывной обработки антителом к PD-1, LO115, и последовательной обработки с помощью AZD7789 после обработки антителом к PD-1. На **фиг. 13С** показана кратность изменения объема опухоли после непрерывной обработки антителом к PD-1, LO115, в сравнении с последовательной обработкой с помощью AZD7789 после обработки антителом к PD-1.

[0040] На **фиг. 14** представлена схема, показывающая предполагаемый механизм действия AZD7789.

[0041] На **фиг. 15А** представлена ленточная диаграмма IgV-домена TIM-3 человека, связанного с Ca⁺⁺. На **фиг. 15В** представлен вид поверхности IgV-домена TIM-3 человека,

связанного с Ca⁺⁺. Нити обозначены заглавными буквами, а петли (BC, CC', C'C", DE и FG) выделены курсивом. Фосфатидилсерин связывается в кармане доменов, определяемых петлями CC' и FG.

[0042] На **фиг. 16А** и **16В** представлены схемы, показывающие связывание антител AZD7789 и F9S. На **фиг. 16А** показано связывание F9S вблизи IgV-домена вблизи петель CC' и FG, рядом с сайтами связывания фосфатидилсерина и ионов Ca⁺⁺. AZD7789 связывается с другой стороной сэндвичной структуры на основе IgV-бета. На **фиг. 16В** показаны антитела в виде лент, связанных в сэндвичную структуру на основе IgV-бета.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0043] Чтобы можно было легче понимать настоящее изобретение, вначале приведено определение некоторых терминов. Как используется в настоящей заявке, за исключением случаев, когда в данном документе прямо предусмотрено иное, каждый из следующих терминов будет иметь значение, изложенное ниже. По всей настоящей заявке изложены дополнительные определения.

5.1 Терминология

[0044] Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает мишень, такую как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанного, и специфически связывается с ней посредством по меньшей мере одного антигенраспознающего сайта в пределах варибельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые белки, содержащие антитело, а также любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина при условии, что антитела демонстрируют требуемую биологическую активность. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) на основании особенностей константных доменов их тяжелой цепи, обозначаемых соответственно как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю. Для разных классов иммуноглобулинов характерны разные и общеизвестные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть "голыми" или конъюгированными с другими молекулами, такими как токсины, радиоактивные изотопы и т. д.

[0045] Если напрямую не заявляется и если контекст не указывает на иное, термин "антитело" включает моноспецифические, биспецифические или полиспецифические антитела, а также одноцепочечное антитело. В некоторых аспектах антитело представляет собой биспецифическое антитело. Термин "биспецифические антитела" относится к

антителам, которые связываются с двумя разными эпитопами. Эпитопы могут находиться на одном и том же антигене-мишени или могут находиться на разных антигенах-мишенях.

[0046] Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела. "Антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающий домен" или "антигенсвязывающая область" относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном. В контексте биспецифического антитела "антигенсвязывающий фрагмент" связывает два антигена. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать антигенраспознающий сайт из интактного антитела (например, определяющие комплементарность области (CDR), достаточные для специфического связывания антигена). Примеры антигенсвязывающих фрагментов антител включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и F_v-фрагменты, линейные антитела и одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен из любого вида животных, таких как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк) и люди, или может быть получен искусственно.

[0047] "Моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относятся к гомогенной популяции антител или их антигенсвязывающих фрагментов, участвующих в высокоспецифическом связывании одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против разных антигенных детерминант. Термин "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает как интактные и полноразмерные моноклональные антитела, так и фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, F_v), одноцепочечные (scF_v) мутантные формы, слитые белки, содержащие часть антитела, и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, содержащие антигенраспознающий сайт. Кроме того, "моноклональное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относятся к таким антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые получены любым из ряда способов, в том числе без ограничения с помощью гибридомы, отбора с использованием фагового дисплея, рекомбинантной экспрессии и трансгенных животных.

[0048] В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, представляют собой поливалентные молекулы. Используемый в пределах настоящей заявки термин "валентный" обозначает наличие определенного числа сайтов связывания в молекуле антитела. К примеру, природное антитело или полноразмерное антитело в соответствии с настоящим изобретением имеет два сайта связывания и является "бивалентным". Термин "тетравалентный" обозначает наличие четырех сайтов связывания в антигенсвязывающем белке. Термин "тривалентный"

обозначает наличие трех сайтов связывания в молекуле антитела. Используемый в данном документе термин "биспецифический, тетравалентный" означает антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, который имеет четыре антигенсвязывающих сайта, из которых по меньшей мере один связывается с первым антигеном и по меньшей мере один связывается со вторым антигеном или другим эпитопом антигена.

[0049] Используемые в данном документе термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" используют взаимозаменяемо, и они являются общепринятыми в уровне техники. Вариабельная область, как правило, относится к части антитела, обычно к части легкой или тяжелой цепи, как правило, к приблизительно 110-120 аминоконцевым аминокислотам или 110-125 аминоконцевым аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и к приблизительно 90-115 аминоконцевым аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые отличаются по последовательности между разными антителами и используются при связывании и определении специфичности конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Вариабельность последовательности сконцентрирована в областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Не желая ограничиваться каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела в отношении антигена. В некоторых аспектах настоящего изобретения вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В некоторых аспектах настоящего изобретения вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) человека. В конкретных аспектах настоящего изобретения вариабельная область представляет собой вариабельную область приматов (например, отличных от человека приматов). В некоторых аспектах настоящего изобретения вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) приматов (например, отличных от человека приматов).

[0050] Термины "VL" и "VL-домен" используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела.

[0051] Термины "VH" и "VH-домен" используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела.

[0052] Термин "нумерация по Kabat" и подобные термины определены в уровне техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах CDR могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Kabat (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 и Kabat EA

et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Согласно используемой системе нумерации по Kabat CDR в пределах молекулы тяжелой цепи антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот 31-35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие после 35 (обозначены в схеме нумерации по Kabat как 35A и 35B) (CDR1), положениях аминокислот 50-65 (CDR2) и положениях аминокислот 95-102 (CDR3). Согласно используемой системе нумерации по Kabat CDR в пределах молекулы легкой цепи антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот 24-34 (CDR1), положениях аминокислот 50-56 (CDR2) и положениях аминокислот 89-97 (CDR3). В некоторых аспектах настоящего изобретения CDR антител, описанных в данном документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Kabat.

[0053] В отличие от этого, Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что схема нумерации по Kabat помещает вставки в H35A и H35B; при этом если не присутствуют ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, то петля заканчивается на 34). Определение гипервариабельных областей по AbM представляет компромисс между определением CDR по Kabat и структурных петель по Chothia и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular.

[0054] Используемые в данном документе термины "константная область" и "константный домен" являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятые значения в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но может демонстрировать различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина в целом имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

[0055] Используемый в данном документе термин "тяжелая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, которые служат основанием для выделения классов антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая

подклассы IgG, например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей хорошо известны из уровня техники. В некоторых аспектах настоящего изобретения тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека.

[0056] Используемый в данном документе термин "легкая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например каппа (κ) или лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны из уровня техники. В некоторых аспектах настоящего изобретения легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[0057] Используемые в данном документе термины "белок-1 запрограммированной гибели", "белок-1 запрограммированной гибели клетки" и "PD-1" используются взаимозаменяемо. Полную последовательность PD-1 можно найти под эталонной последовательностью в NCBI: NG_012110.1. Аминокислотная последовательность белка PD-1 человека представляет собой:

```

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRFVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLVVG VVGGLLGSLLVWVLA VICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAV
PVFSVDY GELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGP
RSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO: 28).

```

[0058] Белок-1 запрограммированной гибели клетки ("PD-1") представляет собой мембранный белок I типа размером примерно 31 кДа, представитель обширного семейства CD28/CTLA-4 регуляторов T-клеток (см. Ishida, Y. et al. (1992) Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," EMBO J. 11: 3887-3895.

[0059] PD-1 экспрессируется на активированных T-клетках, B-клетках и моноцитах (Agata, Y. et al. (1996) "Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes," Int. Immunol. 8(5):765-772; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). PD-1 представляет собой рецептор, отвечающий за супрессию иммунной системы после активации за счет связывания PDL-1 или PDL-2 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298), и функционирует в качестве фактора, индуцирующего гибель клетки (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression of PD-1, A Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", EMBO J. 11: 3887-3895; Subudhi, S. K. et al. (2005) "The Balance of

Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition", J. Molec. Med. 83: 193-202). Этот процесс используется во многих опухолях посредством сверхэкспрессии PD-L1, что приводит к подавлению иммунного ответа.

[0060] PD-1 является хорошо валидированной мишенью для иммуноопосредованной терапии в онкологии с положительными результатами клинических испытаний при лечении, среди прочего, меланомы и форм немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Антагонистическое ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 повышает активацию Т-клеток, усиливая распознавание и элиминацию опухолевых клеток иммунной системой хозяина. Было предложено применение антител к PD-1 для лечения инфекций и опухолей и усиления адаптивного иммунного ответа (см. патенты США № 7521051; 7563869; 7595048).

[0061] Лиганд-1 запрограммированной гибели клетки (PD-L1) также является частью комплексной системы рецепторов и лигандов, которые вовлечены в осуществление контроля активации Т-клеток. В нормальной ткани PD-L1 экспрессируется на Т-клетках, В-клетках, дендритных клетках, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках, тучных клетках, происходящих из костного мозга, а также на различных клетках, не являющихся гемопоэтическими. Его нормальная функция заключается в регуляции баланса между активацией и толерантностью Т-клеток посредством взаимодействия с двумя его рецепторами: белком-1 запрограммированной гибели клетки (также известным как PD-1 или CD279) и CD80 (также известным как B7-1 или B7.1). PD-L1 также экспрессируется опухолями и действует во множестве сайтов, помогая опухолям избежать выявления и устранения иммунной системой хозяина. PD-L1 экспрессируется с высокой частотой при широком спектре форм рака. При некоторых формах рака экспрессия PD-L1 была ассоциирована со снижением выживаемости и неблагоприятным прогнозом. Антитела, которые блокируют взаимодействие между PD-L1 и его рецепторами, способны к ослаблению PD-L1-зависимых иммуносупрессорных эффектов и усилению цитотоксической активности противоопухолевых Т-клеток *in vitro*. Дурвалумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело, направленное против PD-L1 человека, которое способно блокировать связывание PD-L1 с обоими рецепторами PD-1 и CD80. Было предложено применение антител к PD-L1 для лечения инфекций и опухолей и усиление адаптивного иммунного ответа (см. патенты США №№ 8779108 и 9493565, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0062] Используемые в данном документе термины "белок-3, содержащий домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина" и "TIM-3" используются взаимозаменяемо и включают варианты, изоформы, видовые гомологи TIM-3 человека. TIM-3 представляет

собой гликопротеин клеточной поверхности I типа, который содержит N-концевой иммуноглобулиноподобный (Ig) домен, муциновый домен с O-связанными гликозилированиями и с N-связанными гликозилированиями рядом с мембраной, один трансмембранный домен и цитоплазматическую область с мотивом(-ами) фосфорилирования тирозина. TIM-3 является представителем семейства генов T-клеточных белков с трансмембранным доменом, доменом иммуноглобулина и доменом муцина (TIM). Аминокислотная последовательность IgV-домена TIM-3 человека: SEVEYRAEVLGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIK (SEQ ID NO: 29).

[0063] Аминокислотная последовательность белка TIM-3 человека, включая сигнальный пептид, представляет собой:

MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVLGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWG
 KGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGI
 YCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRMLTTRGHGPAET
 QTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFG
 ALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYVEVEEP
 NEYYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP (SEQ ID NO: 30).

[0064] T-клеточный ингибиторный рецептор TIM-3 (белок 3, содержащий домены T-клеточного иммуноглобулина и муцина) играет роль в регуляции противоопухолевого иммунитета, поскольку он экспрессируется на продуцирующих IFN-гамма CD4⁺ Т-хелперах 1 (Th1) и CD8⁺ Т-цитотоксических 1 (Tc1) Т-клетках. Первоначально он был идентифицирован как T-клеточный ингибиторный рецептор, действующий в качестве рецептора иммунной контрольной точки, который функционирует специфически для ограничения продолжительности и величины Т-клеточных ответов с участием Th1 и Tc1. Дальнейшее исследование показало, что путь TIM-3 может взаимодействовать с путем PD-1, что стимулирует развитие тяжелого дисфункционального фенотипа у CD8⁺ Т-клеток при раке. При определенных формах рака он также экспрессировался на регуляторных Т-клетках (T_{reg}). TIM-3 также экспрессируется на клетках врожденной иммунной системы, включая тучные клетки мыши, субпопуляции макрофагов и дендритных клеток (DC), НК- и НКТ-клетки и моноциты человека, а также на линиях первичных бронхиальных эпителиальных клеток мыши. TIM-3 способен генерировать ингибирующий сигнал, приводящий к апоптозу Th1- и Tc1-клеток, а также может опосредовать фагоцитоз апоптотических клеток и перекрестную презентацию антигена.

[0065] Кристаллическая структура IgV-домена TIM-3 показывает наличие двух антипараллельных β -листов, которые соединены с помощью дисульфидной связи. Две дополнительные дисульфидные связи, образованные четырьмя неканоническими цистеинами, стабилизируют IgV-домен и переориентируют петлю CC' в направлении петли FG, вследствие чего образуется структура "карман", который, предположительно, участвует в связывании с лигандом и не обнаружен у других представителей семейства IgSF. Вместо этого, данная упорядоченная структура "карман" представляет собой структурой-сигнатуру, которая идентифицирована у всех белков семейства TIM, включая TIM-1 и TIM-4. Было обнаружено, что контактное взаимодействие соответствующих лигандов с IgV-доменом важно для иммуномодулирующей роли TIM-3 и играет важную роль для индукции периферической толерантности и подавления противоопухолевого иммунитета. Петля C'C" в TIM-3 включает аминокислоты, находящиеся после бета-нити C' и перед бета-нитью C", например, аминокислоты 50-54. Петля DE состоит из аминокислот 64-73, тогда как петля CC' и петля FG содержат аминокислоты 35-43 и 92-99 соответственно.

[0066] TIM-3 имеет несколько известных лигандов, таких как галектин-9, фосфатидилсерин, CEACAM1 и HMGB1. Галектин-9 представляет собой лектин S-типа с двумя отдельными углеводраспознающими доменами, соединенными длинным гибким линкером, и он характеризуется усиленной аффинностью к более крупным структурам, содержащим поли-N-ацетиллактозамин. Галектин-9 не имеет сигнальной последовательности и локализуется в цитоплазме. Однако он может секретироваться и выполнять свою функцию путем связывания с гликопротеинами на поверхности клетки-мишени посредством их углеводных цепей (Freeman G J et al., *Immunol Rev.* 2010 Sep; 235(1): 172-89). На основании исследований связывания, мутагенеза и структуры сокристаллов было показано, что оба TIM-3 человека и мыши являются рецепторами для фосфатидилсерина, и было показано, что клетки, экспрессирующие TIM-3, связывали и/или поглощали апоптотические клетки, экспрессирующие фосфатидилсерин. Взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсерином не исключает взаимодействия с галектином-9, поскольку было обнаружено, что сайты связывания находятся на противоположных сторонах IgV-домена.

[0067] Принимая во внимание участие пути TIM-3 в функционировании ключевых популяций иммунных клеток, которые подвергаются иммуносупрессии при некоторых формах рака, он представляет привлекательного кандидата для иммуноонкологической терапии. См., Anderson, A. C., *Cancer Immunol Res.*, (2014) 2:393-398; и Ferris, R. L., et al., *J Immunol.* (2014) 193:1525-1530.

[0068] Термин "химерные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, где аминокислотная последовательность получена от двух или более видов. Вариабельная область как легкой, так и тяжелой цепей, как правило, соответствует вариабельной области антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), с требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью, тогда как константные области гомологичны последовательностям в антителах или их антигенсвязывающих фрагментах, полученных от другого вида (обычно человека), чтобы избежать развитие иммунного ответа у этого вида.

[0069] Термин "гуманизированное" антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к формам отличным от человеческих (например, мышинных) антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные последовательности, не принадлежащие человеку (например, мышинные). Как правило, гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) заменены остатками из CDR отличного от человека вида (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые характеризуются требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью ("с привитыми CDR") (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях определенные остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками антитела или его фрагмента из вида, отличного от человека, которые характеризуются требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью. Гуманизированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно дополнительно модифицировать посредством замены дополнительных остатков в каркасной области Fv и/или в пределах остатков CDR, не принадлежащих человеку, чтобы усовершенствовать и оптимизировать специфичность, аффинность и/или функциональную способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В целом, гуманизированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент будут содержать вариабельные домены, содержащие все или практически все из CDR-областей, которые соответствуют таковым в иммуноглобулине, отличном от человеческого, тогда как все или практически все из FR-областей являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут содержать по меньшей мере часть константной области или домена

(Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патенте США 5225539; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), и Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). В некоторых аспектах настоящего изобретения "гуманизированное антитело" представляет собой антитело с измененной поверхностью.

[0070] Термин "человеческое антитело" или его антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аминокислотную последовательность, полученную из локуса гена иммуноглобулина человека, при этом такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получены с использованием любой методики, известной из уровня техники. Это определение человеческого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включает интактные или полноразмерные антитела и их фрагменты.

[0071] "Аффинность связывания" в целом относится к силе, определяемой суммой всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, используемая в данном документе "аффинность связывания" относится к внутренне присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в целом может быть представлена константой диссоциации (KD). Аффинность можно измерить и/или выразить с помощью нескольких способов, известных из уровня техники, включая без ограничения равновесную константу диссоциации (KD) и равновесную константу ассоциации (KA). KD рассчитывается на основе отношения k_{off}/k_{on} , тогда как KA рассчитывается на основе отношения k_{on}/k_{off} . Например, K_{on} относится к константе скорости ассоциации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, а, например, k_{off} относится к диссоциации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от антигена. k_{on} и k_{off} можно определить с помощью методик, известных специалисту средней квалификации в данной области, таких как BIAcore® или KinExA.

[0072] Используемый в данном документе термин "эпитоп" известен из уровня техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, происходить из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или

ненепрерывный эпитоп). В некоторых аспектах настоящего изобретения эпитоп, с которым специфически связывается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурных исследований, анализов методом ELISA, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов методом сканирования олигопептидов на основе микроматриц и/или картирующего мутагенеза (например, картирующего сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно выполнять с использованием любого из способов, известных из уровня техники (например, Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антитело/его антигенсвязывающий фрагмент:антиген можно изучать с использованием хорошо известных методик рентгеноструктурного анализа и можно уточнять с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985), volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; US 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed. Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования методом картирующего мутагенеза можно выполнять с использованием любого способа, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 в отношении описания методик мутагенеза, включая методики аланин-сканирующего мутагенеза.

[0073] Антитело, которое "связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными остатками, что и эталонное антитело. Способность антитела связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, можно определить с помощью анализа на основе водород-дейтериевого обмена (см., Coales et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639-647) или рентгеновской кристаллографии.

[0074] Говорится, что антитело "конкурентно ингибирует" связывание эталонного антитела с данным эпитопом или "перекрестно конкурирует" с ним, если оно преимущественно связывается с этим эпитопом или перекрывающимся эпитопом в такой степени, что оно в некоторой степени блокирует связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить с помощью любого способа, известного из уровня техники, например, с помощью конкурентных анализов методом

ELISA. Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела с данным эпитопом на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 50%.

[0075] Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые являются "выделенными", представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которые представлены в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают таковые, которые были очищены до такой степени, что они больше не представлены в такой форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых аспектах настоящего изобретения антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые являются выделенными, являются практически чистыми. Используемый в данном документе "практически чистый" относится к материалу, который является на по меньшей мере 50% чистым (т. е. свободным от контаминантов), на по меньшей мере 90% чистым, на по меньшей мере 95% чистым, на по меньшей мере 98% чистым или на по меньшей мере 99% чистым.

[0076] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимерам из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться компонентами, не являющимися аминокислотами. Данные термины также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгирование с метящим компонентом. В объем данного определения также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (в том числе, например, неприродные аминокислоты и т. п.), а также другие модификации, известные из уровня техники. Следует понимать, что поскольку в основе полипептидов по настоящему изобретению лежат антитела, в некоторых аспектах настоящего изобретения данные полипептиды могут встречаться в виде одиночных цепей или ассоциированных цепей.

[0077] Используемый в данном документе термин "AZD7789" относится к биспецифическому антителу к TIM-3/PD-1, которое содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и

вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22. AZD7789 раскрыто в патенте США № 10457732, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Последовательности моноклонального антитела O13-1 и клона 62, обсуждаемые в данном документе, также раскрыты в патенте США № 10457732, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0078] Используемый в данном документе термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который представлен в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить состав. Состав может быть стерильным.

[0079] Используемые в данном документе термины "вводить", "осуществление введения", "введение" и т. п. относятся к способам, которые могут применяться для осуществления доставки лекарственного средства, например, связывающего белка, нацеленного на TIM-3/PD-1 (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), к требуемому месту биологического действия (например, к внутривенному введению). Методики введения, которые можно использовать в отношении средств и способов, описанных в данном документе, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, текущее издание, Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences*, текущее издание, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

[0080] Используемые в данном документе термины "комбинация" или "введенный в комбинации" означают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описываемые в данном документе, могут вводиться с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут вводиться с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами либо одновременно, либо последовательно. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описываемые в данном документе, могут вводиться с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами в одной и той же или в разных композициях.

[0081] Используемые в данном документе термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо. Субъектом может быть животное. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъектом является млекопитающее, такое как отличное от человека животное (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса, мышь, обезьяна или другой примат и т. д.). В некоторых аспектах настоящего изобретения

субъектом является яванский макак. В некоторых аспектах настоящего изобретения субъектом является человек.

[0082] Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, например, антитела к TIM-3/PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, эффективно для лечения заболевания или нарушения у субъекта. Такие термины, как "осуществление лечения", "лечение", "лечить", "облегчение" и "облегчать", относятся к терапевтическим мерам, с помощью которых излечивают, замедляют, ослабляют симптомы патологического состояния или нарушения и/или останавливают их прогрессирование. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже диагностировано нарушение, или тех, в отношении которых имеется подозрение на наличие у них нарушения.

[0083] Используемая в настоящем описании и формуле изобретения форма единственного числа включает форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[0084] Следует понимать, что во всех случаях, если аспекты настоящего изобретения описаны в данном документе формулировкой "содержащий", также предусмотрены в иных отношениях аналогичные аспекты, описываемые терминами "состоящий из" и/или "состоящий по сути из".

[0085] Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин "или" понимают как включающий. Термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", предполагает включение "как А, так и В", "А или В", "А" и "В". Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", предполагает охват каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0086] Используемые в данном документе термины "приблизительно" и "примерно", в случае их использования для модификации числового значения или числового диапазона, указывают на то, что отклонения на величину от 5% до 10% выше и от 5% до 10% ниже значения или диапазона остаются в пределах предусматриваемой величины приведенного значения или диапазона.

[0087] Любые композиции или способы, представленные в данном документе, можно использовать в комбинации с одним или несколькими из любых других композиций и способов, представленных в данном документе.

[0088] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, которая принята согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают

числа, определяющие диапазон. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты настоящего изобретения, которые могут быть доступны при ссылке на описание в целом. Исходя из этого, термины, определение которых приводится непосредственно ниже, более полно определяются ссылкой на описание во всей его полноте.

5.2 Способы по настоящему изобретению

[0089] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлены способы лечения новым противораковым средством AZD7789, которое одновременно нацеливается на PD-1 и TIM-3. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлены способы применения AZD7789 у пациентов с приобретенной резистентностью к Ю.

[0090] Рентгеноструктурные исследования выявили, что "плечо" AZD7789, связывающееся с TIM-3, отличается от других клинических средств, нацеленных на TIM-3 (например, моноклональных антител), поскольку "плечо", связывающееся с TIM-3, связывается с уникальным эпитопом на внеклеточного домена вариабельной области иммуноглобулина (IgV) TIM-3. Этот эпитоп находится за пределами кармана, связывающего фосфатидилсерин (петля FG-CC'), и состоит из аминокислот N12 (Н-связь), L47, R52 (солевой мостик), D53 (Н-связь), V54, N55, Y56, W57, W62, L63 (Н-связь), N64 (Н-связь), G65, D66 (Н-связь), F67, R68 (Н-связь, солевой мостик), K69 (Н-связь, солевой мостик), D71, T75, E77 (Н-связь). Остатки легкой цепи, входящие в состав паратопа, включают остатки 28-31 из CDR1, 48-53 из CDR2 и остаток 92 из CDR3. Остатки тяжелой цепи, входящие в состав паратопа, включают остатки 30-33 из CDR1, 52-57 из CDR2 и 100-108 из CDR3.

[0091] "Плечо" AZD7789, связывающееся с TIM-3, связывается с IgV-доменом в сайте, противоположном участку связывания с фосфатидилсерином, и не участвует напрямую во взаимодействии с остатками из этих петель. Таким образом, AZD7789 не блокирует взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсерином. Вместо этого AZD7789 увеличивает контактное взаимодействие между TIM-3 и фосфатидилсерином. Этот уникальный механизм улучшает опосредованные Т-клетками противоопухолевые иммунные ответы по сравнению с ответами, наблюдаемыми при использовании антител к TIM3, блокирующих фосфатидилсерин. Соответственно, в некоторых аспектах в данном документе представлен способ изменения контактного взаимодействия между белком-3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), и фосфатидилсерином (PS) у субъекта, при этом способ включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, где TIM-3-связывающий

домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в переменном домене иммуноглобулина (IgV) TIM-3.

А. Способы изменения контактного взаимодействия между TIM-3 и PS

[0092] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ изменения контактного взаимодействия между белком-3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), и фосфатидилсерином (PS) у субъекта. В некоторых аспектах способ включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, раскрытый в данном документе. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в переменном домене иммуноглобулина (IgV) TIM-3.

[0093] В некоторых аспектах способа изменения контактного взаимодействия между TIM-3 и PS у субъекта, раскрытого в данном документе, введение TIM-3-связывающего белка увеличивает противоопухолевую активность у субъекта. В некоторых аспектах противоопухолевая активность увеличивается по сравнению с отсутствием введения связывающего белка (например, антитела). В некоторых аспектах введение TIM-3-связывающего белка увеличивает противоопухолевую активность у субъекта по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-доме TIM-3.

[0094] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ увеличения опосредованной Т-клетками противоопухолевой активности у субъекта. В некоторых аспектах способ увеличения опосредованной Т-клетками противоопухолевой активности у субъекта включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, раскрытый в данном документе. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-доме TIM-3.

[0095] В некоторых аспектах способа увеличения опосредованной Т-клетками противоопухолевой активности у субъекта, раскрытого в данном документе, опосредованная Т-клетками противоопухолевая активность у субъекта увеличивается по сравнению с отсутствием введения связывающего белка (например, антитела). В некоторых аспектах опосредованная Т-клетками противоопухолевая активность у субъекта увеличивается по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-доме TIM-3.

В. Способы увеличения эффероцитоза дендритных клеток и перекрестной презентации опухолевых антигенов

[0096] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлено способ увеличения фагоцитоза апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками. В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка, описанного в данном документе, увеличивает эффероцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками. В некоторых аспектах эффероцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками увеличивается у субъекта по сравнению с отсутствием введения связывающего белка (например, антитела). В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает эффероцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

[0097] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлено способ увеличения перекрестной презентации дендритными клетками опухолевого антигена у субъекта. Перекрестная презентация представляет собой способность определенных антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, поглощать, обрабатывать и презентовать внеклеточные антигены с молекулами МНС I класса CD8⁺ Т-клеткам. Результатом этого процесса является перекрестное праймирование, которое представляет собой стимуляцию наивных цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в активированные цитотоксические CD8⁺ Т-клетки. Этот процесс необходим для иммунитета против большинства опухолей и вирусов, которые с трудом инфицируют антигенпрезентирующие клетки, а скорее против опухолей и вирусов, которые инфицируют клетки периферических тканей. Перекрестная презентация имеет особое значение, поскольку она допускает презентацию экзогенных антигенов, которые в норме презентуются с помощью МНС II на поверхности дендритных клеток, также подвергаться презентации посредством пути МНС I.

[0098] В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка, описанного в данном документе, увеличивает перекрестную презентацию опухолевого антигена дендритными клетками у субъекта. В некоторых аспектах перекрестная презентация опухолевого антигена дендритными клетками увеличивается по сравнению с отсутствием введения связывающего белка (например, антитела). В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает перекрестную презентацию опухолевого антигена дендритными клетками у субъекта относительно введения ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

[0099] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлено способ стимуляции эффероцитоза опухолевого антигена дендритными клетками у субъекта. В некоторых аспектах способа стимуляции эффероцитоза опухолевого антигена

дендритными клетками у субъекта способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, описанный в данном документе. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий белок специфически связывается с петлями С'С" и DE в IgV-домене ТИМ-3.

[0100] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ увеличения перекрестной презентации опухолевых антигенов дендритными клетками у субъекта. В некоторых аспектах способ увеличения перекрестной презентации опухолевых антигенов дендритными клетками у субъекта включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, описанный в данном документе. В некоторых аспектах ТИМ-3-связывающий белок специфически связывается с петлями С'С" и DE в IgV-домене ТИМ-3. В некоторых аспектах уровень перекрестной презентации дендритными клетками увеличивается по сравнению с отсутствием введения связывающего белка (например, антитела). В некоторых аспектах уровень перекрестной презентации дендритными клетками у субъекта увеличивается по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и СС') в IgV-домене ТИМ-3.

[0101] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, введение ТИМ-3-связывающего белка, описанного в данном документе, увеличивает секрецию ИЛ-2 при контактном взаимодействии с ТИМ-3-положительными Т-клетками у субъекта. В некоторых аспектах секреция ИЛ-2 увеличивается по сравнению с отсутствием введения связывающего белка (например, антитела). В некоторых аспектах введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает секрецию ИЛ-2 при контактном взаимодействии с ТИМ-3-положительными Т-клетками у субъекта по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и СС') в IgV-домене ТИМ-3.

5.3 Популяции пациентов

[0102] В данном документе представлены способы лечения форм рака (например, плоскоклеточной или неплоскоклеточной NSCLC) у пациентов-людей с использованием любого способа, раскрытого в данном документе, например, с помощью биспецифического антитела (например, AZD7789) или его антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых аспектах у пациента имеется солидная опухоль. В некоторых аспектах у пациента имеется распространенная или метастатическая солидная опухоль.

[0103] В некоторых аспектах у субъекта имеется одно или несколько из рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы,

рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака пищевода, рака желудка, опухолей желчных путей, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза.

[0104] Также в данном документе представлены способы лечения форм рака у субъекта с приобретенной резистентностью к средству иммуноонкологии (ИО). В некоторых аспектах субъектом является человек.

[0105] В некоторых аспектах у субъекта была документирован рака на стадии III, которая не поддается излечивающему оперативному вмешательству или лучевой терапии. В некоторых аспектах у субъекта имеется стадия IV немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). В некоторых аспектах NSCLC представляет собой плоскоклеточную или неплоскоклеточную NSCLC.

[0106] В некоторых аспектах у субъекта с приобретенной резистентностью к средству иммуноонкологии (ИО) имеется радиологически документированное прогрессирование опухоли или клиническое ухудшение после первоначального лечения с помощью терапии, нацеленной на PD-1/PD-L1, в течение минимум 3-6 месяцев, в качестве монотерапии или в комбинации с химиотерапией, и имелись признаки начальной клинической пользы, т. е. стабилизация или регресс заболевания.

[0107] В некоторых аспектах средство терапии, нацеленное на PD-1, представляет собой антитело, выбранное из ниволумаба (также известного как OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538), пембролизумаба (Merck; также известного как KEYTRUDA®, ламбролизумаб и MK-3475; см. WO2008/156712), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; также известного как AMP-514; см. WO 2012/145493), цемиплимаба (Regeneron; также известного как REGN-2810; см. WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; см. Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 70:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; см. WO 2015/35606 и US 2015/0079109), INCSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; также известного как SHR-1210; см. WO 2015/085847; Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 70: 136 (2017)), TSR-042 (Tesaro Biopharmaceutical; также известного как ANB011; см. WO2014/179664), педилизумаба (Medivation/CureTech; см. патент США № 8686119 B2 или WO 2013/014668 A1); GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; также известного как WBP3055; см. Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 70: 136 (2017)), AM- 0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; см. WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; см. WO 2017/040790), MGA012 (MacroGenics, см. WO 2017/19846) и IBI308 (Innovent; см. WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540). В некоторых аспектах средство терапии, нацеленное на PD-1, представляет

собой антагонист PD-1, AMP-224, который представляет собой рекомбинантный слитый белок, составленный из внеклеточного домена лиганда-2 для лиганда запрограммированной гибели клетки PD-1 (PD-L2) и Fc-области IgG человека. AMP-224 обсуждается в публикации заявки на патент США № 2013/0017199. Содержание каждой из этих ссылок включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0108] В некоторых аспектах средство терапии, нацеленное на PD-L1, представляет собой антитело, выбранное из BMS-936559 (также известного как 12A4, MDX-1105; см., например, патент США № 7943743 и WO 2013/173223), атезолизумаба (Roche; также известного как TECENTRIQ®; MPDL3280A, RG7446; см. патент США № 8217149; см. также, Herbst *et al.* (2013) *J Clin Oncol* 31(suppl):3000), дурвалумаба (AstraZeneca; также известного как IMFINZI™, MEDI-4736; см. WO 2011/066389), авелумаба (Pfizer; также известного как BAVENCIO®, MSB-0010718C; см. WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; см. WO2013/181634), CX-072 (Cytomx; см. WO2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; см. Zhang *et al.*, *Cell Discov.* 7:3 (March 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; см., например, WO 2017/034916) и CK-301 (Checkpoint Therapeutics; см. Gorelik *et al.*, AACR:Abstract 4606 (Apr 2016)). Содержание каждой из этих ссылок включено в данный документ посредством ссылки во всех своей полноте.

[0109] В определенных аспектах способов, раскрытых в данном документе, приобретенная резистентность к IO определяется как:

(i) воздействие средства монотерапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение менее 6 месяцев с первоначальным наилучшим общим ответом (BOR) в виде частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1; или

(ii) воздействие средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение 6 месяцев или больше, отдельно или в комбинации с химиотерапией; с BOR в виде стабилизации заболевания, частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1.

[0110] В определенных аспектах способов, раскрытых в данном документе, приобретенная резистентность к IO определяется как воздействие средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение 6 месяцев или больше, отдельно или в комбинации с химиотерапией; с наилучшим общим ответом (BOR) в виде стабилизации заболевания, частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование

заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1.

[0111] В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, у субъекта балл пропорции опухоли (TPS) по PD-L1 составляет 1% или больше. В некоторых аспектах пациент не получал предшествующую системную терапию в качестве терапии первой линии. В некоторых аспектах предшествующая системная терапия представляет собой средство терапии IO, отличное от средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1. В некоторых аспектах субъект получал предшествующую нео/адьювантную терапию, но у него отсутствовало прогрессирование в течение по меньшей мере 12 месяцев после последнего введения средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1. В некоторых аспектах у субъекта TPS по PD-L1 составляет 50% или больше.

5.4 Результаты лечения

[0112] У пациента, получающего лечение согласно способам, раскрытым в данном документе, предпочтительно наблюдается улучшение по меньшей мере одного признака рака. В одном аспекте улучшение измеряют как уменьшение количества и/или размера измеримых очагов опухоли. В другом аспекте очаги можно измерить на рентгенограммах грудной клетки или на пленках КТ или МРТ. В другом аспекте для оценки способности отвечать на средство терапии можно применять цитологический или гистологический анализы. В некоторых аспектах ответ опухоли на введение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть определен по результатам оценок опухоли исследователем и определен в соответствии с рекомендациями RECIST v1.1. Дополнительные измерения опухоли могут быть выполнены на усмотрение исследователя или в соответствии с институциональной практикой.

[0113] В некоторых аспектах у пациента, прошедшего лечение, наблюдается полный ответ (CR), т. е. исчезновение всех очагов-мишеней. В некоторых аспектах у пациента, прошедшего лечение, наблюдается частичный ответ (PR), т. е. уменьшение суммы диаметров очагов-мишеней на по меньшей мере 30%, при этом за эталон принимают сумму диаметров на исходном уровне. В некоторых аспектах у пациента, прошедшего лечение, наблюдается прогрессирование заболевания (PD), т. е. увеличение суммы диаметров очагов-мишеней на по меньшей мере 20%, при этом за эталон принимают наименьшую сумму в исследовании (она включает сумму на исходном уровне, если таковая является наименьшей в исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20% сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение на по меньшей мере 5 мм. (Примечание: появление одного или нескольких новых очагов может считаться прогрессированием). В некоторых аспектах у пациента, прошедшего лечение, наблюдается

стабилизация заболевания (SD), т. е. не наблюдается достаточного уменьшения размеров, чтобы соответствовать PR, не наблюдается достаточного увеличения, чтобы соответствовать PD, при этом за эталон принимают наименьшую сумму диаметров в исследовании.

[0114] В другом аспекте у пациента, прошедшего лечение, наблюдается уменьшение размеров опухоли и/или снижение скорости роста, т. е. торможение роста опухоли. В некоторых аспектах нежелательная клеточная пролиферация уменьшается или ингибируется. В некоторых аспектах может произойти одно или несколько из следующего: может уменьшаться число раковых клеток; может уменьшаться размер опухоли; может подавляться, тормозиться, замедляться или останавливаться инфильтрация раковых клеток в периферические органы; может замедляться или подавляться метастазирование опухоли; может подавляться рост опухоли; может предупреждаться или откладываться рецидив опухоли; могут облегчаться в определенной степени один или несколько симптомов, ассоциированных с раком.

[0115] В других аспектах введение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из способов, представленных в данном документе, обеспечивает по меньшей мере один терапевтический эффект, выбранный из группы, состоящей из уменьшения размера опухоли, уменьшения числа метастатических очагов, появляющихся со временем, полной ремиссии, частичной ремиссии или стабилизации заболевания.

[0116] В некоторых аспектах для определения ответа опухоли на введение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из способов, представленных в данном документе, можно применять получение одного или нескольких биоптатов опухоли. В некоторых аспектах образец представляет собой фиксированный формалином залитый в парафин (FFPE) образец. В некоторых аспектах образец представляет собой свежий образец. Образцы опухоли (например, биоптаты) могут использоваться для идентификации прогностических и/или фармакодинамических биомаркеров, ассоциированных с иммунным и опухолевым микроокружением. Такие биомаркеры могут быть определены с помощью анализов, включая ИС, анализ опухолевых мутаций, анализ РНК и протеомные анализы. В определенных аспектах экспрессию опухолевых биомаркеров выявляют с помощью RT-PCR, гибридизации *in situ*, анализа с защитой от РНКаз, анализа на основе RT-PCR, иммуногистохимического исследования, твердофазного иммуноферментного анализа, визуализации *in vivo* или проточной цитометрии.

5.5 Биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[0117] В данном документе представлены способы лечения форм рака у субъекта (например, субъекта-человека), включающие введение субъекту антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с TIM-3 и PD-1 (например, TIM-3 и PD-1 человека). В некоторых аспектах антитела к TIM-3 и PD-1 (например, TIM-3 и PD-1 человека) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно применять в способах, представленных в данном документе, включают AZD7789, моновалентное биспецифическое гуманизированное моноклональное антитело (mAb) на основе иммуноглобулина G1 (IgG1), которое специфически связывает TIM-3 и PD-1 и нацеливается на уникальный эпитоп TIM-3.

[0118] AZD7789 был сконструирован на остове молекулы DuetMab. Структура DuetMab описана в Mazor et al., *MAbs*. 7(2): 377–389, (2015 Mar-Apr 2015), который настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Структура "DuetMab" включает технологию "выступы во впадины" (КИН) для гетеродимеризации 2 различных тяжелых цепей и увеличивает эффективность спаривания когнатных тяжелых и легких цепей за счет замены нативной дисульфидной связи на одной из поверхностей контакта CH1-CL на сконструированную дисульфидную связь.

[0119] AZD7789 включает мутацию по типу "выступ" в тяжелой цепи, содержащей вариабельную область, которая связывается с TIM-3, и мутацию по типу "впадина" в тяжелой цепи, содержащей вариабельную область, которая связывается с PD-1.

[0120] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, специфически связывается с TIM-3 человека и PD-1 человека и содержит CDR антитела AZD7789, представленные в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR VH¹

Антитело	CDR1 VH (SEQ ID NO:)	CDR2 VH (SEQ ID NO:)	CDR3 VH (SEQ ID NO:)
Плечо для TIM-3 в AZD 7789	SYAMS (SEQ ID NO: 1)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	GSYGTYYGNFYF EY (SEQ ID NO: 3)
Плечо для PD- 1 в AZD	DYGMH (SEQ ID NO: 4)	YISSGSYTIYSADSVKG (SEQ ID NO: 5)	RAPNSFYEYYF DY

7789			(SEQ ID NO: 6)
------	--	--	----------------

¹CDR VH в таблице 1 определены в соответствии с Kabat.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR VL²

Антитело	CDR1 VL (SEQ ID NO:)	CDR2 VL (SEQ ID NO:)	CDR3 VL (SEQ ID NO:)
Плечо для TIM-3 в AZD 7789	GGDNIGGKSVH (SEQ ID NO: 7)	YDSDRPS (SEQ ID NO: 8)	QVLDRRSDHFL (SEQ ID NO: 9)
Плечо для PD-1 в AZD 7789	SASSKHTNLYWSRHMYWY (SEQ ID NO: 10)	LTSNRAT (SEQ ID NO: 11)	QQWSSNP (SEQ ID NO: 12)

²CDR VL в таблице 2 определены в соответствии с Kabat.

[0121] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок содержит определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 9 соответственно. В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок содержит определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 13 соответственно.

[0122] В некоторых аспектах настоящего изобретения TIM-3-связывающий домен биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для применения в способах, описанных в данном документе, специфически связывается с уникальным эпитопом на IgV-домене TIM-3. Эпитоп на IgV-домене TIM-3 содержит N12, L47, R52, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71, T75 и E77 из TIM-3 (SEQ ID NO: 29).

[0123] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок дополнительно содержит связывающий домен для белка-1 запрограммированной гибели клетки (PD-1). В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен содержит первый набор определяющих комплементарность областей (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные

последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 9 соответственно; и PD-1-связывающий домен содержит второй набор CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11 и 12 соответственно.

[0124] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок дополнительно содержит связывающий домен для белка-1 запрограммированной гибели клетки (PD-1). В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен содержит первый набор определяющих комплементарность областей (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 13 соответственно; и PD-1-связывающий домен содержит второй набор CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11 и 12 соответственно.

[0125] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, специфически связывается с TIM-3 и PD-1 человека и содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела AZD7789, перечисленные в таблице 3.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности VH и VL

Антитело	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)
VH плеча для TIM-3 в AZD 7789	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGSYGTYGNYFEYWGGTLTVSS (SEQ ID NO: 14)
VL плеча для TIM-3 AZD 7789	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVL VIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDR RSDHFLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 17)
VH плеча для PD-1 в AZD	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGL

7789	LEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 19)
VL плеча для PD-1 в AZD 7789	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMWYQQKP GQAPRLLIYLTNSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)

[0126] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, ТИМ-3-связывающий белок содержит переменный домен первой тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, переменный домен первой легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, VH второй тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, и VL второй легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

[0127] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, специфически связывается с ТИМ-3 и PD-1 человека, и содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) антитела AZD7789, перечисленные в таблице 4.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)
HC плеча для ТИМ-3 в AZD 7789	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGGQTLVTVSSASTKGPSVCP LAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSVDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)
LC	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVL

плеча для TIM-3 в AZD 7789	VIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDR RSDHFLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLIS DFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS (SEQ ID NO: 18)
HC плеча для PD-1 в AZD 7789	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKG LEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH E DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)
LC плеча для PD-1 в AZD 7789	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQQKP GQAPRLLIYLT SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

[0128] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

[0129] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, вторую тяжелую

цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

[0130] В некоторых аспектах настоящего изобретения биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, описанных в данном документе, TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

[0131] В некоторых аспектах TIM-3-связывающий белок биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для применения в способах, описанных в данном документе, содержит агликозилированную Fc-область. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий белок содержит дегликозилированную Fc-область. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий белок содержит Fc-область, которая характеризуется сниженным фукозилированием или является афукозилированной.

5.6 Способы лечения

[0132] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у субъекта. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения NSCLC у субъекта, имеющего распространенную или метастатическую NSCLC.

[0133] В некоторых аспектах способ лечения NSCLC у субъекта, имеющего распространенную или метастатическую NSCLC, включает введение субъекту биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и TIM-3-связывающий домен, где биспецифический связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и где у субъекта имеется приобретенная резистентность к IO. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен по настоящему изобретению специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домена TIM-3.

[0134] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ подавления роста немелкоклеточной опухоли легкого у субъекта, имеющего распространенную или метастатическую опухоль. В некоторых аспектах способа подавления роста немелкоклеточной опухоли легкого у субъекта, имеющего

распространенную или метастатическую опухоль, способ включает введение субъекту биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и TIM-3-связывающий домен, где биспецифический связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и где у субъекта имеется приобретенная резистентность к Ю. В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене TIM-3.

[0135] В некоторых аспектах TIM-3-связывающий домен биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и TIM-3-связывающий домен, описанные в данном документе, специфически связывается с эпитопами на IgV-домене TIM-3, и эпитопы содержат N12, L47, R52, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71, T75 и E77 из TIM-3 (SEQ ID NO: 29).

[0136] В некоторых аспектах NSCLC представляет собой плоскоклеточную или неплоскоклеточную NSCLC.

[0137] В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у субъекта с приобретенной резистентностью к Ю. В некоторых аспектах способ лечения рака у субъекта с приобретенной резистентностью к Ю включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене TIM-3. В некоторых аспектах рак представляет собой одно или несколько из рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака пищевода, рака желудка, опухолей желчных путей, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза. В некоторых аспектах субъектом является человек. В некоторых аспектах, у субъекта документирована стадия III, которая не поддается излечивающему оперативному вмешательству или лучевой терапии, или стадия IV немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC).

[0138] В некоторых аспектах введение TIM-3-связывающего белка, приводит к подавлению роста опухоли у субъекта.

[0139] Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

6. ПРИМЕРЫ

[0140] Примеры в данном разделе (т. е. в разделе 6) предлагается в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

6.1 Пример 1. Определение характеристик IgV-домена TIM-3

[0141] Исследовали взаимодействия IgV-домена TIM-3 с антигенсвязывающими фрагментами моноклонального антитела к TIM3 № 62 ("№ 62" или "клон 62"). Клон 62 является исходным для антитела к TIM-3, O13-1, которое представляет собой вариант клона 62 с созревшей аффинностью. Последовательности mAb O13-1 и клона 62 раскрыты в патенте США № 10457732, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Кристаллизация, сбор данных и определение структуры

[0142] Чтобы получить структуры в виде сокристалла IgV-домена TIM-3 с антигенсвязывающими фрагментами (Fab), все белки экспрессировали в клетках млекопитающих и очищали до гомогенности. Очищенный IgV-домен TIM-3 и Fab-фрагменты (по одному за раз) инкубировали при небольшом избытке IgV-домена, после чего комплекс очищали методом разделения по размеру. Кристаллизацию комплексов проводили при комнатной температуре. Данные рентгеновской дифракции получали в Стэнфордском источнике синхротронного излучения (SSRL, Менло-Парк, Калифорния, США). Структуры комплексов расшифровывали с помощью метода молекулярного замещения.

[0143] Кристаллическую структуру Fab-фрагмента антитела к TIM3, № 62, связанного с IgV-доменом TIM-3, определяли при разрешении 2,2 Å. С антигеном взаимодействовали как тяжелые, так и легкие цепи Fab-фрагмента. Две цепи Fab-фрагмента создают площадь поверхности контакта, составляющую 815 Å², из которых 365 Å² приходится на легкую цепь, а 450 Å² приходится на тяжелую цепь. Всего во взаимодействии участвуют 27 аминокислот из обеих цепей Fab-фрагмента и 19 аминокислот из IgV-домена TIM-3. Некоторые аминокислоты TIM-3 взаимодействовали с обеими цепями Fab-фрагмента.

[0144] Следующие аминокислоты IgV-домена являются составной частью поверхности контакта и/или участвуют во взаимодействиях с тяжелой цепью антитела к TIM3, № 62: Fab: N12, L47, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, T75 и E77. Среди них аминокислоты N12, L63 (основная цепь) и E77 образуют водородные связи с CDR 2 и 3 тяжелой цепи.

Водородные связи, созданные между тяжелой цепью антитела к TIM3, № 62, и IgV-доменом TIM-3.

1 G:ASN 12[ND2]	3,71 H:TYR 104[OH]
2 G:LEU 63[N]	3,15 H:GLY 102[O]
3 G:LEU 63[O]	2,97 H:TYR 104[N]
4 G:GLU 77[OE2]	2,57H:SER 54[OG]

[0145] В Fab-фрагменте тяжелой цепи антитела к TIM3, № 62, следующие аминокислоты являются составной частью поверхности контакта и/или участвуют во взаимодействии с IgV-доменом TIM-3: S30, S31, Y32 и A33 (все являются составной частью CDR1 тяжелой цепи), S52, G53, S54, G56, S57 (все являются составной частью CDR2 тяжелой цепи), S100, Y101, G102, T103, Y104, Y105, N107 и Y108 (все являются составной частью CDR3 тяжелой цепи).

[0146] Следующие аминокислоты IgV-домена являются составной частью поверхности контакта и/или участвуют во взаимодействии с Fab-фрагментами легкой цепи антитела к TIM3: R52, D53, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71.

Водородные связи, созданные между легкой цепью антитела к TIM3, № 62, и IgV-доменом TIM-3

1 G:ARG 68[NH1]	3,57 L:TYR 49[O]
2 G:LYS 69[NZ]	2,72 L:GLY 28[O]
3 G:LYS 69[NZ]	2,99 L:ASP 50[OD2]
4 G:ASP 53[OD2]	3,22 L:TYR 48[OH]
5 G:ASN 64[O]	2,82 L:ARG 92[NE]
6 G:ASP 66[OD1]	2,58 L:SER 31[OG]
7 G:ASP 66[OD2]	2,91 L:SER 31[N]

Солевые мостики, созданные между тяжелой цепью антитела к TIM3, № 62, и IgV-доменом TIM-3

1 G:ARG 52[NE]	3,97 L:ASP 52[OD2]
2 G:ARG 68[NH2]	3,02 L:ASP 52[OD1]
3 G:ARG 68[NH2]	2,83 L:ASP 52[OD2]
4 G:LYS 69[NZ]	2,99 L:ASP 50[OD2]

[0147] В Fab-фрагменте легкой цепи антитела к TIM3, № 62, следующие аминокислоты являются составной частью поверхности контакта и/или участвуют во взаимодействии с IgV-доменом TIM-3: G28, G29, K30 и S31 (все являются составной частью CDR1 легкой цепи), Y48, Y49, D50, S51, D52, R53 (все являются составной частью CDR2 легкой цепи) и R92 (является составной частью CDR3 легкой цепи).

[0148] Это демонстрирует, что антигенсвязывающие фрагменты антитела к TIM3, № 62, связываются с IgV-доменом со стороны, противоположной связыванию фосфатидилсерина. Это связывание не вносит изменений в укладку или структуру IgV-домена TIM-3. Модели IgV-домена из этой структуры выравниваются со связанным фосфатидилсерином при среднеквадратичном отклонении 0,7 Å. Поверхность контакта при взаимодействии антитела к TIM3, № 62, с IgV-доменом TIM-3 не включает гликозилированный аспарагин в положении 78 и не присоединяется к углеводу самому по себе.

6.2 Пример 2. Связывание TIM-3 с фосфатидилсерином

[0149] Фосфатидилсерин наносили в концентрации 30 мкг/мл на многоатричный 96-луночный планшет (Meso Scale Discovery) и оставляли испаряться на протяжении ночи. Планшеты блокировали с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина. Титрацию лекарственных средств проводили для получения кривой с 7 точками данных при 5-кратном серийном разведении, начиная с 10 мкг/мл. Затем 5 мкг/мл IgV TIM-3, конъюгированного с SULFO-меткой (Meso Scale Discovery), предварительно инкубировали с лекарственным средством в течение 15 минут перед добавлением на планшет. После периода инкубации продолжительностью 1,5 часа планшеты промывали и сигнал электрохимиллюминесценции обнаруживали на приборе MESO SECTOR S600 (Meso Scale Discovery) (фиг. 1А).

[0150] Данные, представленные на **фиг. 1А**, демонстрируют, что исходное mAb к TIM-3 в составе AZD7789 (т. е. mAb O13-1) увеличивает связывание TIM-3 с фосфатидилсерином по сравнению с изотипическим контролем. И наоборот, титрация mAb к TIM-3, F9S, блокирует взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсерином. В целом эти данные указывают на то, что антитела, которые связываются с разными эпитопами TIM-3, могут по-разному модулировать взаимодействие TIM-3 и фосфатидилсерина.

[0151] Затем фосфатидилсерин наносили в концентрации 30 мкг/мл на многоатричный 96-луночный планшет (Meso Scale Discovery) и оставляли испаряться на протяжении ночи. Планшеты блокировали с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина. Титрацию лекарственных средств проводили для получения кривой с 7 точками данных при 4-кратном серийном разведении, начиная со 150 мкг/мл. Затем добавляли по 1,67 мкг/мл IgV TIM-3, конъюгированного с SULFO-меткой (Meso Scale Discovery), на

лунку сразу после добавления лекарственного средства. После периода инкубации продолжительностью два часа планшеты промывали и сигнал электрохимиллюминесценции обнаруживали на приборе MESO SECTOR S600 (Meso Scale Discovery). Для каждой обработки лунки оценивали в двух повторностях (**фиг. 1В**).

[0152] Эти данные демонстрируют, что моновалентного контактного взаимодействия на эпитопе C'CC"/DE в TIM-3, подтвержденного связыванием AZD7789 в сравнении со связыванием O13-1 к TIM-3, достаточно для увеличения взаимодействия TIM-3 с фосфатидилсерином по сравнению с изотипическим контролем. Напротив, два независимо полученных антитела к TIM-3, которые связываются с CC'/FG TIM-3 (mAb F9S и mAb 'N'), блокировали взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсерином. В целом эти данные указывают на то, что антитела, которые связываются с разными эпитопами TIM-3, могут по-разному модулировать взаимодействие TIM-3 и фосфатидилсерина, и этот эффект можно наблюдать при моновалентном и бивалентном контактном взаимодействии.

6.3 Пример 3. Связывание IgV TIM3 с убитой линией клеток меланомы A375

[0153] Клетки меланомы A375 убивали с помощью 1 мкМ/мл стауроспорина в течение 24 часов. На следующий день клетки промывали и высевали по двести тысяч клеток на лунку. Титрацию лекарственного средства проводили посредством 5-кратного серийного разведения, и его инкубировали совместно с 10 мкг/мл IgV TIM-3 в течение 45 минут. Затем смесь лекарственного средства/IgV TIM3 инкубировали с апоптотическими клетками A375. Через 45 минут клетки промывали с помощью холодного буфера и фиксировали с помощью 4% PFA в течение 20 минут. Данные получали на приборе BD Symphony A2 и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Графики строили с использованием PRISM. Для каждой обработки лунки оценивали в двух повторностях (**фиг. 2**).

[0154] Данные, представленные на **фиг. 2**, показывают, что AZD7789 и клон O13-1 усиливают связывание растворимого IgV TIM-3 с апоптотическими клетками меланомы, в то время как антитело к PD-1, LO115, этого не делает. Антитело E2E к TIM-3 и антитела Duet LO115/F9S уменьшают контактное взаимодействие TIM-3 с апоптотическими клетками.

6.4 Пример 4. Линии клеток Jurkat, сконструированные для экспрессии TIM-3 человека

[0155] Линию клеток Jurkat сконструировали для экспрессии TIM-3 человека (клетки Jurkat с h-TIM-3). В каждую лунку высевали по двести тысяч клеток. Титрацию лекарственного средства проводили для 9 точек при 4-кратном серийном разведении,

начиная с 10 мкг/мл. Сразу после добавления лекарственного средства клетки стимулировали растворимыми антителом к CD3 (2,5 мкг/мл) и антителом к CD28 (0,5 мкг/мл). Через 24 часа супернатант собирали и IL-2 оценивали с помощью электрохемилюминесцентного обнаружения с использованием набора для обнаружения IL-2 человека в тканевых культурах от Meso Scale Discovery. Для каждой обработки лунки оценивали в двух повторностях

[0156] Как показано на **фиг. 3**, нелидерное оптимизированное и лидерное оптимизированное исходные mAb к TIM-3 в AZD7789 (антитела к TIM-3 № 62 и O13 соответственно) увеличивают продукцию IL-2 в клетках Jurkat с h-TIM-3 по сравнению с изотипическим контролем при стимуляции Т-клеток (планки погрешностей представляют SEM). Наоборот, mAb к TIM-3, 41 или F9S, снижают продукцию IL-2 при тех же условиях стимуляции. В целом, эти данные указывают, что антитела, которые связываются с разными эпитопами TIM-3, могут вызывать различные результаты в анализе стимуляции клеток Jurkat с TIM3 человека. Изменение в одну аминокислоту между нелидерным оптимизированным клоном 62 и лидерным оптимизированным клоном 13 не изменяет функциональный результат в этом анализе стимуляции клеток Jurkat.

[0157] В отдельном исследовании в каждую лунку высевали по двести тысяч клеток Jurkat с h-TIM-3. Титрацию лекарственного средства проводили для 9 точек при 3-кратном серийном разведении, начиная с 10 мг/мл. Сразу после добавления лекарственного средства клетки стимулировали с помощью антитела к CD3 (1 мкг/мл)/антитела к CD28 (0,5 мкг/мл). Через 24 часа супернатант собирали и IL-2 оценивали с помощью электрохемилюминесцентного обнаружения с использованием набора для обнаружения IL-2 человека в тканевых культурах от Meso Scale Discovery (**фиг. 4**). Для каждой обработки лунки оценивали в двух повторностях Планки погрешностей представляют SEM. Антитела к TIM-3, "N", "J" и "L", используемые для сравнения, получали на основе патентных последовательностей. Антитело к TIM-3, 2E2, является коммерчески доступным (Leaf-очищенное антитело к CD366 человека, Biolegend).

[0158] Как показано на **фиг. 4**, титрация исходного mAb к TIM-3, O13-1, увеличивает продукцию IL-2 клетками Jurkat с h-TIM-3 при стимуляции Т-клеток. И наоборот, титрация всех других mAb к TIM-3, оцениваемых в данном анализе, снижает продукцию IL-2 при тех же условиях стимуляции. В целом, эти данные указывают, что антитела, которые связываются с разными эпитопами TIM-3, могут вызывать различные результаты в анализе стимуляции клеток Jurkat с экспрессией TIM-3 человека.

[0159] В другом исследовании с клетками Jurkat с h-TIM-3 титрацию лекарственного средства проводили для 11 точек при 3-кратном серийном разведении, начиная с 30 мкг/мл.

В случае группы обработки "антитело к TIM-3 O13-1 (титрация) + антитело к TIM-3 F9S (постоянная)", клетки инкубировали при постоянной концентрации mAb к TIM-3 F9S (10 мкг/мл) перед добавлением титрации mAb к TIM-3 O13-1. После добавления лекарственного средства клетки стимулировали с помощью антитела к CD3 (1 мкг/мл)/антитела к CD28 (0,5 мкг/мл). Через 24 часа супернатант собирали и IL-2 оценивали с помощью электрохемилюминесцентного обнаружения с использованием набора для обнаружения IL-2 человека в тканевых культурах от Meso Scale Discovery (**фиг. 5**).

[0160] Как показано на **фиг. 5**, наблюдаемое увеличение продукции IL-2 простимулированными клетками Jurkat с h-TIM-3 после добавления mAb к TIM-3, O13-1, полностью исчезает, если клетки культивируют при высокой концентрации mAb к TIM-3, F9S, которое блокирует взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсерином. Эти данные указывают на то, что продукция IL-2, индуцированная с помощью mAb к TIM-3, O13-1, зависит от взаимодействия TIM-3 с фосфатидилсерином, и прекращение этого взаимодействия препятствует усилению секреции IL-2.

[0161] Затем исходные Т-клетки Jurkat сравнивали с двумя линиями клеток Jurkat, генетически сконструированными для экспрессии TIM-3 человека дикого типа и его мутантных (R111A) вариантов. R111 является критически важным остатком для связывания TIM-3 с фосфатидилсерином. Мутация R111A в TIM-3 отменяет связывание фосфатидилсерина с TIM-3 (Gandhi *et al.*, *Scientific Reports* 2018; 8:17512; Nakayama *et al.*, *Blood*, 2009). После добавления лекарственного средства клетки стимулировали с помощью антитела к CD3 (2,5 мкг/мл)/антитела к CD28 (0,5 мкг/мл). Через 24 часа супернатант собирали и IL-2 оценивали с помощью электрохемилюминесцентного обнаружения с использованием набора для обнаружения IL-2 человека в тканевых культурах от Meso Scale Discovery (**фиг. 6**). Данные объединяли из трех независимых экспериментов с обработкой при концентрации 50 нМ. Планки погрешностей представляют SEM. ****, $p < 0,0001$.

[0162] Данные, представленные на **фиг. 6** указывают, что экспрессия TIM-3, наряду с контактным взаимодействием с фосфатидилсерином, требуется для опосредованного O13-1, mAb к TIM-3, увеличения продукции IL-2 клетками Jurkat, экспрессирующими TIM-3, после стимуляции.

6.5 Пример 5. Секреция IFN- γ в первичных Т-клетках человека

[0163] Свежие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух здоровых доноров высевали из расчета 40000 клеток/лунку. Титрацию лекарственного средства проводили для 4 точек при 10-кратном серийном разведении, начиная с 100 нМ. Линию клеток яичника китайского хомячка (CHO) сконструировали для экспрессии на поверхности клеток человеческого антитела ОКТ3 к CD3 в виде одноцепочечного

вариабельного фрагмента (scFv). Для индуцирования апоптоза клетки СНО-ОКТЗ облучали (10 Гр), и их высевали по 5000 клеток на лунку. Клетки совместно культивировали в течение трех дней. Затем собирали супернатант и IFN- γ оценивали с помощью электрохемилюминесцентного обнаружения с использованием набора для обнаружения IFN- γ человека в тканевых культурах от Meso Scale Discovery (**фиг. 7А** и **7В**). Планки погрешностей представляют SEM для лунок в трех повторностях. **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

[0164] Данные, показанные на **фиг. 7А** и **7В**, указывают, что AZD7789 и его исходное бивалентное mAb к TIM-3, O13-1, усиливают секрецию IFN- γ у первичных Т-клеток человека, простимулированных в контексте клеточного апоптоза. Дело обстоит иначе в случае антител к TIM-3 или биспецифических молекул, блокирующих фосфатидилсерин.

6.6 Пример 6. Эффект AZD7789 на эффероцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками

[0165] Дендритные клетки человека (DC) получали из свежесыведенных моноцитов, культивируемых в присутствии 100 нг/мл IL-4 и 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в течение 6 дней. Для индукции апоптоза линии клеток Jurkat обрабатывали стауроспорином с концентрацией 100 нМ в течение 24 часов. Затем апоптотические клетки Jurkat метили с помощью красного красителя Incucyte®pHrodo® с концентрацией 1 нг/мл. Апоптотические клетки культивировали совместно с DC, полученными из моноцитов, при соотношении 4:1 в присутствии тестируемых лекарственных средств. Планшеты помещали внутрь системы для визуализации живых клеток Incucyte® S3. Фотографии делали каждые 15 минут в течение 24 часов. Красную флуоресценцию измеряли и анализировали с использованием программного обеспечения Incucyte® S3 2018В. Графические изображения данных выполняли с использованием GraphPad Prism версии 8.04.02 для Windows (программное обеспечение GraphPad). На **фиг. 8А** показан пример репрезентативных данных одного эксперимента, полученных с использованием программного обеспечения Incucyte® S2 2018В. На **фиг. 8В** показано графическое представление данных, объединенных из более чем 10 независимых экспериментов. Кратность изменения эффероцитоза на **фиг. 8В** определяли относительно группы без обработки лекарственными средствами. ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$.

[0166] Данные, показанные на **фиг. 8А** и **8В** демонстрируют, что AZD7789 может усиливать эффероцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками. В отличие от этого, антитело, нацеливающееся на карман связывания фосфатидилсерина в TIM-3 (mAb F9S), показало сниженный эффект по сравнению с контрольными группами.

6.7 Пример 7. Эффект AZD7789 на перекрестную презентацию опухолевого антигена DC

[0167] Две линии клеток Jurkat конструировали таким образом, чтобы они экспрессировали один из антигенов MART-1 или CMVpp65 человека соответственно. Эти линии клеток служили в качестве опухолевых клеток в пределах анализа. Для индукции апоптоза линии клеток Jurkat с MART-1 и CMVpp65 обрабатывали стауроспорином с концентрацией 100 нМ в течение 24 часов. Дендритные клетки человека (DC) получали из свежевыделенных моноцитов, культивируемых в присутствии 100 нг/мл IL-4 и 100 нг/мл GM-CSF в течение шести дней. Моноциты выделяли из крови здорового донора, положительного по HLA-A*02. Дендритные клетки культивировали совместно с апоптотическими клетками Jurkat с MART-1 или CMVpp65 (соотношение 1:4) в присутствии тестируемых образцов и инкубировали в течение 24 часов для обеспечения эффероцитоза и процессинга антигена. Из замороженных PBMC получали антигенспецифические Т-лимфоциты, совпадающие с донорскими, и их стимулировали пептидами в течение семи дней с использованием антигенного пептида MART-1 (Leu26) - HLA-A*0201 (ELAGIGILTV) или антигенного пептида CMV pp65 - HLA-A*0201 (NLVPMVATV). После 24-часового DC-эффероцитоза клеток Jurkat с MART-1 или CMVpp65, оставшиеся апоптотические клетки Jurkat удаляли с помощью 2-кратной промывки лунок средой. Антигенспецифические Т-клетки метили красителем для определения пролиферации CellTrace и культивировали совместно с DC при соотношении 1:4 (DC:Т-клетки) в течение семи дней. Через семь дней Т-клетки окрашивали для выявления CD3, CD8 и антигенной специфичности с использованием декстрамера: HLA-A*0201/NLVPMVATV - антиген: pp65 или декстрамера: HLA-A*0201/ELAGIGLTV - антиген MART-1. Проллиферацию антигенспецифических Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (**фиг. 9А** и **9В**). Столбчатые графики показывают лунки в двух повторностях для эксперимента с клетками Jurkat с MART-1 и лунки в трех повторностях для эксперимента с клетками Jurkat с CMVpp65, планки погрешностей представляют SEM; *, $p < 0,05$.

[0168] Данные, представленные на **фиг. 9А** и **9В**, указывают, что AZD7789 может усиливать перекрестную презентацию опухолевого антигена с помощью DC Т-клеткам. Этот эффект отличается от аналогичного модулятора, блокирующего сайт связывания фосфатидилсерина на TIM-3 (Duet LO115/F9S). Этот пример демонстрирует, что AZD7789 может улучшать противоопухолевые ответы за счет усиленной перекрестной презентации с помощью DC антигенспецифическим Т-клеткам.

6.8 Пример 8. Сравнение подавления роста опухоли и выживаемости для антитела к PD-1 и AZD7789

[0169] Иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) в день исследования 0 подкожно приживляли 2×10^6 клеток OE21-10xGSV3, плоскоклеточная карцинома пищевода человека, сконструированных для экспрессии представляющих интерес вирусных пептидов. Спустя семь дней реактивные к вирусным пептидам CD8+ Т-клетки, происходящие из PBMC здорового донора, вводили внутривенно (1×10^6 /мышь). mAb к PD-1, LO115, или AZD7789, содержащее mAb к PD-1/TIM3, вводили внутрибрюшинно, начиная в день 10 исследования, и мыши получили в общей сложности 4 дозы (10 мг/кг) с интервалом 2-3 дня между введением доз. Объем опухоли постоянно контролировали. Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал 2000 мм^3 . На графике объема опухоли (**фиг. 10А**) показаны сравнения эффекта обработки между изотипическим контролем, AZD7789 и mAb к PD-1, LO115; n=8 мышей/обработка, все обработки проводили в дозе 10 мг/кг. Выживаемость мышей для разных групп обработки показана на **фиг. 10В**.

Эти результаты на **фиг. 10А-В** демонстрируют, что в гуманизированной мышинной модели антигенспецифической опухоли обработка с помощью AZD7789 задерживает рост опухоли и увеличивает выживаемость по сравнению с мышами, которых постоянно обрабатывали антителом к PD-1 или изотипическим контролем. Это позволяет предположить, что лечение с помощью AZD7789 может принести пользу пациентам в большей степени, чем средство терапии, нацеленное на PD-1.

6.9 Пример 9. Эффект введения AZD7789 на рост опухоли

[0170] Сорока восьми иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) в день 1 подкожно приживляли 2×10^6 клеток OE21-10xGSV3, плоскоклеточная карцинома пищевода человека, сконструированных для экспрессии представляющих интерес вирусных пептидов. Специфические для опухолевого антигена CD8+ Т-клетки, происходящие из PBMC двух здоровых доноров (D203517 и D896), вводили внутривенно (1×10^6 /мышь) в день 7. В день 8 мышей рандомизировали по объему опухоли в 6 групп разной обработки с 8 мышами в каждой группе. Тестируемые и контрольные образцы вводили внутрибрюшинно, начиная с дня 9, и мыши получили в общей сложности 4 дозы (каждая по 10 мг/кг). На **фиг. 11А** и **11В** изображен объем опухоли в день 13 для двух независимых исследований с разными донорами Т-клеток (D203517 и D896). Провели сравнение объема опухоли между изотипическим контролем и всеми другими обработками лекарственными средствами, и межгрупповые различия проанализировали в отношении статистической значимости с помощью однофакторного дисперсионного анализа

(ANOVA), критерия Тьюки для множественных сравнений. Каждый символ представляет кратность изменения объема опухоли от исходного уровня до дня введения третьей дозы (день 13) тестируемых или контрольных образцов. Горизонтальные полосы представляют внутригрупповое среднеарифметическое значение объема опухоли. ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$.

[0171] Данные, показанные на **фиг. 11А** и **11В**, демонстрируют, что обработка с помощью AZD7789 приводит к снижению роста опухоли по сравнению с обработкой с помощью только антител к PD-1 или обработкой с помощью комбинации антитела к PD-1 и блокирующей фосфатидилсерин молекулы, нацеленной на TIM-3. Такую тенденцию наблюдали для двух разных доноров.

6.10 Пример 10. Эффект AZD7789 на секрецию IFN- γ у простимулированных ex-vivo инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, предварительно подвергшихся воздействию средства терапии, нацеленного на PD-1, на гуманизированной мышинной модели опухоли

[0172] Иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) в день исследования 0 подкожно приживляли 2×10^6 клеток OE21-10xGSV3, плоскоклеточная карцинома пищевода человека, сконструированных для экспрессии представляющих интерес вирусных пептидов. Спустя семь дней реактивные к вирусным пептидам CD8⁺ Т-клетки, происходящие из РВМС здорового донора, вводили внутривенно (1×10^6 /мышь). mAb к PD-1, LO115, вводили внутрибрюшинно, начиная в день 10 исследования, и мыши получили в общей сложности 4 дозы (10 мг/кг) с интервалом 2-3 дня между дозами. Объем опухоли постоянно контролировали. Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал 2000 мм³. Опухоли подвергали диссоциации с получением суспензии одиночных клеток. Клетки центрифугировали с градиентом фиколла для сохранения жизнеспособных клеток и высевали по $0,1 \times 10^6$ на лунку. В соответствующие лунки добавляли тестовые и контрольные образцы (10 нМ), рекомбинантный IL-2 человека (20 МЕ/мл) и $0,02 \times 10^6$ клеток T2, активированных с помощью пептида GILGFVFTL в концентрации 1,5 мг/мл. Спустя семьдесят два часа супернатант собирали и IFN- γ оценивали с помощью электрохемилюминесцентного обнаружения с использованием набора для обнаружения IFN- γ человека в тканевых культурах от Meso Scale Discovery. Схема элементов описанного эксперимента, выполняемых *in vivo* и *ex vivo*, показана на **фиг. 12А**. Кратность изменения IFN- γ определяли путем сравнения с результатами, полученными при добавлении лекарственного средства *ex vivo* к группе изотипического контроля. Оценивали опухоли, которых получали у шести мышей, обработанных

антителом к PD-1 (**фиг. 12В**). На **фиг. 12С** показан репрезентативный график IFN- γ на основании одной опухоли, предварительно подвергнутой воздействию антитела к PD-1, которую простимулировали *ex vivo* с помощью обработки лекарственным средством. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

[0173] Данные, показанные на **фиг. 12А-12С** указывают, что AZD7789 может увеличивать секрецию IFN- γ у простимулированных *ex vivo* TIL, взятых от мышей, у которых наблюдали прогрессирование на фоне обработки антителом к PD-1. Данный пример демонстрирует, что AZD7789 может улучшать противоопухолевые ответы клеток, которые больше не отвечают на средство терапии, нацеленное на PD-1.

6.11 Пример 11. Влияние последовательной обработки AZD7789 после обработки с помощью антитела к PD-1 на рост опухоли в гуманизированной мышинной модели опухоли

[0174] Тридцати двум иммунодефицитным мышам NSG подкожно приживляли 3×10^6 клеток PC9-MART-1, линия клеток аденокарциномы человека, сконструированных для экспрессии опухолевого антигена меланомы, MART-1. В день 14 MART-1-реактивные CD8⁺ Т-клетки, происходящие из PBMC здорового донора, вводили внутривенно (5×10^6 клеток/мышь). Мышей рандомизировали по объему опухоли, и тестируемые и контрольные образцы в дозе 10 мг/кг вводили внутривенно в дни 15, 17, 20, а затем в дни 23, 27 и 30. Мышей, обработанных антителом к PD-1, повторно рандомизировали через 24 часа после введения третьей дозы в день 21 на основании кратности изменения объема опухоли по сравнению с исходным уровнем и разделили на 2 когорты; 10 мышей, которые продолжали получать обработку антителом к PD-1, и 10 мышей, которых перевели на обработку с помощью AZD7789. На графике объема опухоли (**фиг. 13А**) показаны сравнения обработки между изотипическим контролем, AZD7789, только mAb к PD-1, LO115, и антителом к PD-1, за которым следует последовательная обработка с помощью AZD7789 (три дозы антитела к PD-1, за которыми следуют три дозы AZD7789); $n=8$ мышей/обработка и все обработки проводили в дозе 10 мг/кг. Статистические данные оценивали с помощью двухфакторного ANOVA с критерием Тьюки для множественных сравнений. Статистические данные, показанные в пределах графика в моменты времени 5 (день 28) и 6 (день 31), сравнивают группу обработки антителом к PD-1 с группой обработки антителом к PD-1 \rightarrow AZD7789, ***, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$. Все остальные статистические данные сравнивают группы в момент времени день 35, через 5 дней после последней обработки: ***, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

[0175] Эти результаты демонстрируют, что в гуманизированной мышинной модели антигенспецифической опухоли последовательная обработка с помощью AZD7789 после

обработки антителом к PD-1 может задерживать рост опухоли по сравнению с мышами, которых постоянно обрабатывали антителом к PD-1. Это позволяет предположить, что лечение с помощью AZD7789 может принести пользу пациентам, которые больше не отвечают на средство терапии, нацеленное на PD-1.

6.12 Пример 12. Эффект последовательной обработки AZD7789 после обработки с помощью антитела к PD-1 на рост опухоли в гуманизированной мышинной модели опухоли

[0176] Иммунодефицитным мышам NSG в день 1 подкожно приживляли 2×10^6 клеток OE21-10xGSV3, плоскоклеточная карцинома пищевода человека, сконструированных для экспрессии представляющих интерес вирусных пептидов. Спустя семь дней внутривенно вводили реактивные в отношении вируса CD8⁺ Т-клетки, происходящие из РВМС человека, выделенные от здорового донора (1×10^6 клеток/мышь). Мышей рандомизировали по объему опухоли в день 8 в назначенные группы обработки. Тестируемые и контрольные образцы вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг, начиная с дня 9. На **фиг. 13В** мыши получали 2 дозы изотипического контроля или антитела к PD-1 в дни 9 и 11, после чего мышей, обработанных антителом к PD-1, рандомизировали на основе кратности изменения объема опухоли по сравнению с исходным уровнем на 3 отдельные группы обработки, и впоследствии им вводили две дозы одного из антитела к PD-1 (α PD-1, продолжение), изотипического контроля (α PD \rightarrow Изотип. контроль) или AZD7789 (α PD1 \rightarrow AZD7789) в дни 14 и 17. На графике на **фиг. 13В** показано различие в объеме опухоли между группами обработки в день 18 через 24 часа после введения второй дозы последовательной обработки. Межгрупповые различия проанализировали в отношении статистической значимости с помощью однофакторного ANOVA, критерия Тьюки для множественных сравнений. На **фиг. 13С** мышей обрабатывали 3 дозами антитела к PD-1 в дни 9, 13 и 16 перед проведением рандомизации в день 16 в группы последующей обработки. В исследованиях использовали РВМС человека от трех здоровых доноров (D896, D1051, D1063). Каждый символ представляет кратность изменения объема опухоли от времени проведения повторной рандомизации (после введения 3 доз антител к PD-1; день 16) до 24 часов после введения первой дозы в группе последовательной обработки в день 20. Сравнение между кратностью изменения объема опухоли для разных групп обработки анализировали в отношении статистической значимости с помощью непарного t-критерия. Горизонтальные полосы представляют внутригрупповое среднеарифметическое значение кратности изменения. **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$. $n=10$ мышей на группу обработки. Все виды обработки вводили в дозе 10 мг/кг.

[0177] Этот пример демонстрирует, что во второй гуманизированной мышинной модели антигенспецифической опухоли последовательная обработка с помощью AZD7789 после обработки антителом к PD-1 может задерживать рост опухоли по сравнению с мышами, которых постоянно обрабатывали антителом к PD-1. Этот результат позволяет предположить, что лечение с помощью AZD7789 может принести пользу пациентам, больше не отвечающим на средство терапии, нацеленное на PD-1.

[0178] В целом, эти примеры демонстрируют, что AZD7789 модулирует различные субпопуляции клеток со стимулированием противоопухолевого ответа (фиг. 14).

6.13 Пример 13. Сравнительная характеристика связывающих эпитопов

[0179] Характеристики предполагаемых связывающих эпитопов исходных клонов антител O13-1 (исходный клон AZD7789) и F9S определяли посредством различных способов и сравнивали с известными антителами к TIM-3. Как показано ниже в таблице 5, рентгеноструктурные исследования и анализы конкурентного связывания подтвердили, что mAb O13-1 связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене TIM-3. Напротив, большинство других протестированных антител к TIM-3 связывались преимущественно с петлями CC' и FG (фиг. 15А и В; см. Gandhi *et al.*, *Scientific Reports* 2018; 8:17512). Одно протестированное mAb связывалось с петлями BC и CC' (WO 2015/117002), и одно mAb связывалось с петлями DE (WO 2016/111947).

Таблица 5.

	Клон(-ы) антитела	Способ для определения характеристик предполагаемо го связывающего эпитопа	Связывающие петли в IgV TIM-3 человека					Эталон
			В С	С '	С' "	Д Е	Ф Г	
AZ#1	O13-1	a, b						
AZ#2	F9S	a, b						

Novartis	ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum21	a, b, c					WO 2015/117002
Tesaro	APE5137 APE5121	d					US 2018/012750 0 A1
Lilly	A, B и C	a, b, e					US 2018/005759 1 A1
Jounce	mAb15	d, f					WO 2016/111947 A2
Agenus	pab2085, pab2187, pab2188, AM2, AM6	c, e, g, h					US 2017/036816 8 A1
BMS	TIM3.2, TIM3.18 13A3, 3G4, 17C3, 17C8	c, e, i					US 2018/001633 6 A1
Roche	TIM3_002 2, TIM3_002 8, TIM3_003 8	b					WO 2016/071448

a рентгеноструктурные исследования

b анализы конкурентного связывания

с эксперименты с водород-дейтериевым обменом

d связывание или функциональные свойства подобны таковым у эталонного антитела к

ТМЗ человека, клон 2E2

e блокада взаимодействия фосфатидилсерина с ТМЗ

*f обмен доменами; домены *hi*ТМЗ заменены соответствующими доменами *to*ТМЗ*

g потеря связывания с ТМЗ-3 в результате аланинового сканирования

h Анализ Pepscan - связывание с пептидными фрагментами, родственными ТМЗ, полученными в виде пептидной матрицы, связанной с чипом

i Картирование эпитопов методом дисплея на поверхности дрожжей

[0180] Как показано в таблице 5, способы, указанные в таблице, применяли для определения характеристик связывания с петлями переменного (IgV) домена иммуноглобулина ТМЗ-3 человека, связанного антителами к ТМЗ-3. Каждое из эталонных антител прочно связывалось с перечисленными связывающими петлями за двумя исключениями: различные антитела, раскрытые в WO 2015/117002, слабо связывались с петлей BC, и mAb15, раскрытое в WO 2016/111947 A2, слабо связывалось с петлей DE. Антитела (или производные), которые связывались с CC'- и FG-доменами и блокировали фосфатидилсерин, характеризовались наиболее выраженной функциональной активностью по сравнению с антителами, которые связывались с петлями C'C' и DE (WO 2016/111947 A2, US 2018/0016336 A1); при этом антитела, которые связывали петли C'C" и DE (WO 2016/071448), не были отобраны для наиболее охарактеризованного впоследствии биспецифического антитела PD1/TIM3 (WO 2017/055404).

[0181] Кроме того, как показано на **фиг. 16A** и **16B**, два разработанных в лаборатории антитела, клон 62 (плечо ТМЗ-3 в AZD7789) и F9S, связывают IgV-домен ТМЗ-3 неконкурентным образом. F9S (показан светло-серой лентой на **фиг. 16B**) связывается с IgV-доменом возле петель CC' и FG, вблизи связывающих сайтов для фосфатидилсерина и ионов Ca⁺⁺ (**фиг. 16A**). Клон 62 (показан черным контуром) связывается с другой стороны сэндвичной структуры на основе IgV-бета. Эпитоп клона 62 включает петли BC, C'C", DE и короткую нить D.

[0182] Этот пример подтверждает, что AZD7789 связывается с уникальным эпитопом в IgV-домене ТМЗ-3 на стороне, противоположной связыванию с фосфатидилсерином (**фиг. 15A** и **15B** (Gandhi et al., *Scientific Reports* 2018; 8:17512)). Это связывание не вносит изменений в укладку или структуру IgV-домена ТМЗ-3 и не блокирует взаимодействие ТМЗ-3 с фосфатидилсерином (**фиг. 2**). Напротив, AZD7789 увеличивает контактное взаимодействие между ТМЗ-3 и фосфатидилсерином (**фиг. 2**). Этот уникальный механизм улучшает опосредованные Т-клетками противоопухолевые иммунные ответы по

сравнению с ответами, наблюдаемыми при использовании известных антител к ТМЗ, блокирующих фосфатидилсерин (фиг. 11-13).

* * *

[0183] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. В действительности различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным станут очевидными специалистам в данной области техники из предшествующего описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

[0184] Все литературные источники (например, публикации, или патенты, или заявки на патент), цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный литературный источник (например, публикация, или патент, или заявка на патент) был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Таблица последовательностей

Описание	Последовательность
CDR1 VH плеча для TIM-3 в AZD 7789	SYAMS (SEQ ID NO: 1)
CDR2 VH плеча для TIM-3 в AZD 7789	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)
CDR3 VH плеча для TIM-3 в AZD 7789	GSYGTYYGNYFEY (SEQ ID NO: 3)
CDR1 VH плеча для PD-1 в AZD 7789	DYGMH (SEQ ID NO: 4)
CDR2 VH плеча для PD-1 в AZD 7789	YISSGSYTIYSADSVKG (SEQ ID NO: 5)
CDR3 VH плеча для PD-1	RAPNSFYEYYFDY (SEQ ID NO: 6)

в AZD 7789	
CDR1 VL плеча для TIM-3 в AZD 7789	GGDNIGGKSVH (SEQ ID NO: 7)
CDR2 VL плеча для TIM-3 в AZD 7789	YSDRPS (SEQ ID NO: 8)
CDR3 VL плеча для TIM-3 в AZD 7789	QVLDRRSDHFL (SEQ ID NO: 9)
CDR1 VL плеча для PD-1 в AZD 7789	SASSKHTNLYWSRHMYWY (SEQ ID NO: 10)
CDR2 VL плеча для PD-1 в AZD 7789	LTSNRAT (SEQ ID NO: 11)
CDR3 VL плеча для PD-1 в AZD 7789	QQWSSNP (SEQ ID NO: 12)
CDR3 VL плеча для TIM-3 (№ 62)	QVLDRRSDHWL (SEQ ID NO: 13)
VH плеча для TIM-3 в AZD 7789	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)
HC плеча для TIM-3 в AZD 7789	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGQGTLVTVSSAST KGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

	<p>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)</p>
<p>Вариабельная область легкой цепи VL плеча для TIM3 (№ 62)</p>	<p>QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQA PVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEADYY CQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 16)</p>
<p>VL плеча для TIM-3 в AZD 7789</p>	<p>SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQA PVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVLDRRSDHFLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 17)</p>
<p>LC плеча для TIM-3 в AZD 7789</p>	<p>SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQA PVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVLDRRSDHFLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPCSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEV S (SEQ ID NO: 18)</p>
<p>VH плеча для PD-1 в AZD 7789</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 19)</p>
<p>HC плеча для PD-1 в AZD 7789</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGGQTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI</p>

	<p>AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)</p>
<p>VL плеча для PD-1 в AZD 7789</p>	<p>QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQ QKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)</p>
<p>LC плеча для PD-1 в AZD 7789</p>	<p>QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQ QKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEN (SEQ ID NO: 22)</p>
<p>Тяжелая цепь TIM-3</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGGQTITVTVSSASTK GPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLLE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEW VSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTY GNYFEYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSYVL TQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLV IYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVL DRRSDHFLFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 23)</p>

<p>Вариабельная область легкой цепи TIM-3</p>	<p>QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQ QKPGQAPRLLIYLT SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQWSSNPFTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 24)</p>
<p>Тяжелая цепь TIM-3</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGGQTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGGGGSGGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEY WGQGT LVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGD NIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYYCQVLD RRSDFHFLFGCGTKLTVLGG GGSGGGGSGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)</p>
<p>Легкая цепь TIM-3</p>	<p>QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQ QKPGQAPRLLIYLT SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQWSSNPFTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 26)</p>

<p>Вариабельная область тяжелой цепи VH плеча для TIM3 (№62)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)</p>
<p>Аминокислотная последовательность белка PD-1 человека</p>	<p>MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPAL LVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFE DRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLV VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICRAARGTIGARRTGQPLKED PSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSG MGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO: 28)</p>
<p>IgV-домен TIM-3 человека</p>	<p>SEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFEC GNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLAD SGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIK (SEQ ID NO: 29)</p>
<p>Белок TIM-3 человека</p>	<p>MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPA APGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYW LNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKL VIKPAKVTPAPTRQRDFTAAPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPD INLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLAL ALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRS EENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP (SEQ ID NO: 30)</p>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ изменения контактного взаимодействия между белком-3, содержащим домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), и фосфатидилсеринном (PS) у субъекта, при этом способ включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C'' и DE в переменном домене иммуноглобулина (IgV) TIM-3.

2. Способ по п. 1, где введение TIM-3-связывающего белка увеличивает противоопухолевую активность у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела.

3. Способ по п. 1, где введение TIM-3-связывающего белка увеличивает противоопухолевую активность у субъекта по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-доме TIM-3.

4. Способ увеличения опосредованной Т-клетками противоопухолевой активности у субъекта, при этом способ включает введение субъекту TIM-3-связывающего белка, содержащего TIM-3-связывающий домен, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C'' и DE в IgV-доме TIM-3.

5. Способ по п. 4, где опосредованная Т-клетками противоопухолевая активность у субъекта увеличивается по сравнению с отсутствием введения антитела.

6. Способ по п. 4, где опосредованная Т-клетками противоопухолевая активность у субъекта увеличивается по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-доме TIM-3.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где введение TIM-3-связывающего белка увеличивает фагоцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела.

8. Способ по любому из пп. 1-6, где введение TIM-3-связывающего белка увеличивает фагоцитоз апоптотических опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта по сравнению с введением TIM-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-доме TIM-3.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где введение TIM-3-связывающего белка увеличивает перекрестную презентацию опухолевых антигенов дендритными клетками у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела.

10. Способ по любому из пп. 1-8, где введение TIM-3-связывающего белка увеличивает перекрестную презентацию опухолевых антигенов дендритными клетками у субъекта по

сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

11. Способ стимулирования фагоцитоза опухолевых клеток дендритными клетками у субъекта, при этом способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, где ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене ТИМ-3.

12. Способ увеличения перекрестной презентации опухолевых антигенов дендритными клетками у субъекта, при этом способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, где ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'C" и DE в IgV-домене ТИМ-3.

13. Способ по п. 12, где уровень перекрестной презентации дендритными клетками увеличивается по сравнению с отсутствием введения антитела.

14. Способ по п. 12, где уровень перекрестной презентации дендритными клетками у субъекта увеличивается по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает секрецию IL-2 при контактном взаимодействии с ТИМ-3-положительными Т-клетками у субъекта по сравнению с отсутствием введения антитела.

16. Способ по любому из пп. 1-14, где введение ТИМ-3-связывающего белка увеличивает секрецию IL-2 при контактном взаимодействии с ТИМ-3-положительными Т-клетками у субъекта по сравнению с введением ТИМ-3-связывающего белка, который связывается с PS-связывающим карманом (петли FG и CC') в IgV-домене ТИМ-3.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где введение ТИМ-3-связывающего белка приводит к подавлению роста опухоли у субъекта.

18. Способ по п. 17, где опухоль представляет собой распространенную или метастатическую солидную опухоль.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где у субъекта имеется одно или несколько из рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака пищевода, рака желудка, опухолей желчных путей, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где у субъекта имеется приобретенная резистентность к средству иммуноонкологии (ИО).

21. Способ лечения рака у субъекта с приобретенной резистентностью к Ю, где способ включает введение субъекту ТИМ-3-связывающего белка, содержащего ТИМ-3-связывающий домен, где ТИМ-3-связывающий домен специфически связывается с петлями С'С" и DE в IgV-домене ТИМ-3.

22. Способ по п. 21, где рак представляет собой одно или несколько из рака яичника, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечно-клеточной карциномы, рака легкого, рака пищевода, рака желудка, опухолей желчных путей, уротелиальной карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза.

23. Способ по любому из пп. 1-23, где субъект представляет собой человека.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где у субъекта была документирована стадия III, которая не поддается излечивающему оперативному вмешательству или лучевой терапии, или стадия IV немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC).

25. Способ по п. 24, где NSCLC представляет собой плоскоклеточную или неплоскоклеточную NSCLC.

26. Способ по любому из пп. 1-25, 45 и п. 46, где у субъекта имеется радиологически документированное прогрессирование опухоли или клиническое ухудшение после первоначального лечения с помощью средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение минимум 3-6 месяцев, в качестве монотерапии или в комбинации с химиотерапией, и имелись признаки начальной клинической пользы, т. е. стабилизация или регресс заболевания.

27. Способ по любому из пп. 20-26, 45 и п. 46, где приобретенная резистентность к Ю определяется как:

(i) воздействие средства монотерапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение менее 6 месяцев с первоначальным наилучшим общим ответом (BOR) в виде частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1; или

(ii) воздействие средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение 6 месяцев или больше, отдельно или в комбинации с химиотерапией; с BOR в виде стабилизации заболевания, частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1.

28. Способ по любому из пп. 20-26, 45 и п. 46, где приобретенная резистентность к Ю определяется как воздействие средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1, в течение 6 месяцев или больше, отдельно или в комбинации с химиотерапией; с наилучшим общим ответом (BOR) в виде стабилизации заболевания, частичного регресса или полного регресса, за которым следует прогрессирование заболевания во время лечения или прогрессирование заболевания через 12 недель или меньше после прекращения лечения, нацеленного на PD-1/PD-L1.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где у субъекта балл пропорции опухоли (TPS) по PD-L1 составляет 1% или больше.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где субъект не получал предшествующую системную терапию в качестве терапии первой линии.

31. Способ по п. 30, где предшествующая системная терапия представляет собой средство терапии Ю, отличное от средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1.

32. Способ по п. 30, где субъект получал предшествующую нео/адьювантную терапию, но у него отсутствовало прогрессирование в течение по меньшей мере 12 месяцев после последнего введения средства терапии, нацеленного на PD-1/PD-L1.

33. Способ по п. 32, где у субъекта TPS по PD-L1 составляет 50% или больше.

34. Способ по любому из пп. 1-33, где TIM-3-связывающий белок содержит определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 9 соответственно или SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 13 соответственно.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с эпитопами на IgV-домене TIM-3, и эпитопы содержат N12, L47, R52, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71, T75 и E77 из TIM-3 (SEQ ID NO: 29).

36. Способ по любому из пп. 1-35, где TIM-3-связывающий белок дополнительно содержит связывающий домен для белка-1 запрограммированной гибели клетки (PD-1).

37. Способ по п. 36, где TIM-3-связывающий домен содержит первый набор областей, определяющих комплементарность (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8 и 9 или 1, 2, 3, 7, 8 и 13 соответственно; и

PD-1-связывающий домен содержит второй набор CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11 и 12 соответственно.

38. Способ по п. 37, где TIM-3-связывающий белок содержит вариабельный домен первой тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, вариабельный домен первой легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, VH второй тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, и VL второй легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

39. Способ по п. 37, где TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

40. Способ по п. 37, где TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

41. Способ по п. 37, где TIM-3-связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

42. Способ по любому из пп. 24-26, где TIM-3-связывающий белок содержит агликозилированную Fc-область.

43. Способ по любому из пп. 24-26, где TIM-3-связывающий белок содержит дегликозилированную Fc-область.

44. Способ по любому из пп. 24-28, где TIM-3-связывающий белок, содержит Fc-область, которая характеризуется сниженным фукозилированием или является афукозилированной.

45. Способ лечения NSCLC у субъекта, имеющего распространенную или метастатическую NSCLC, при этом способ включает введение субъекту биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и TIM-3-связывающий домен,

где биспецифический связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22,

и где у субъекта имеется приобретенная резистентность к Ю.

46. Способ подавления роста немелкоклеточной опухоли легкого у субъекта с распространенной или метастатической немелкоклеточной опухолью легкого, при этом способ включает введение субъекту биспецифического связывающего белка, содержащего PD-1-связывающий домен и TIM-3-связывающий домен,

где биспецифический связывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22,

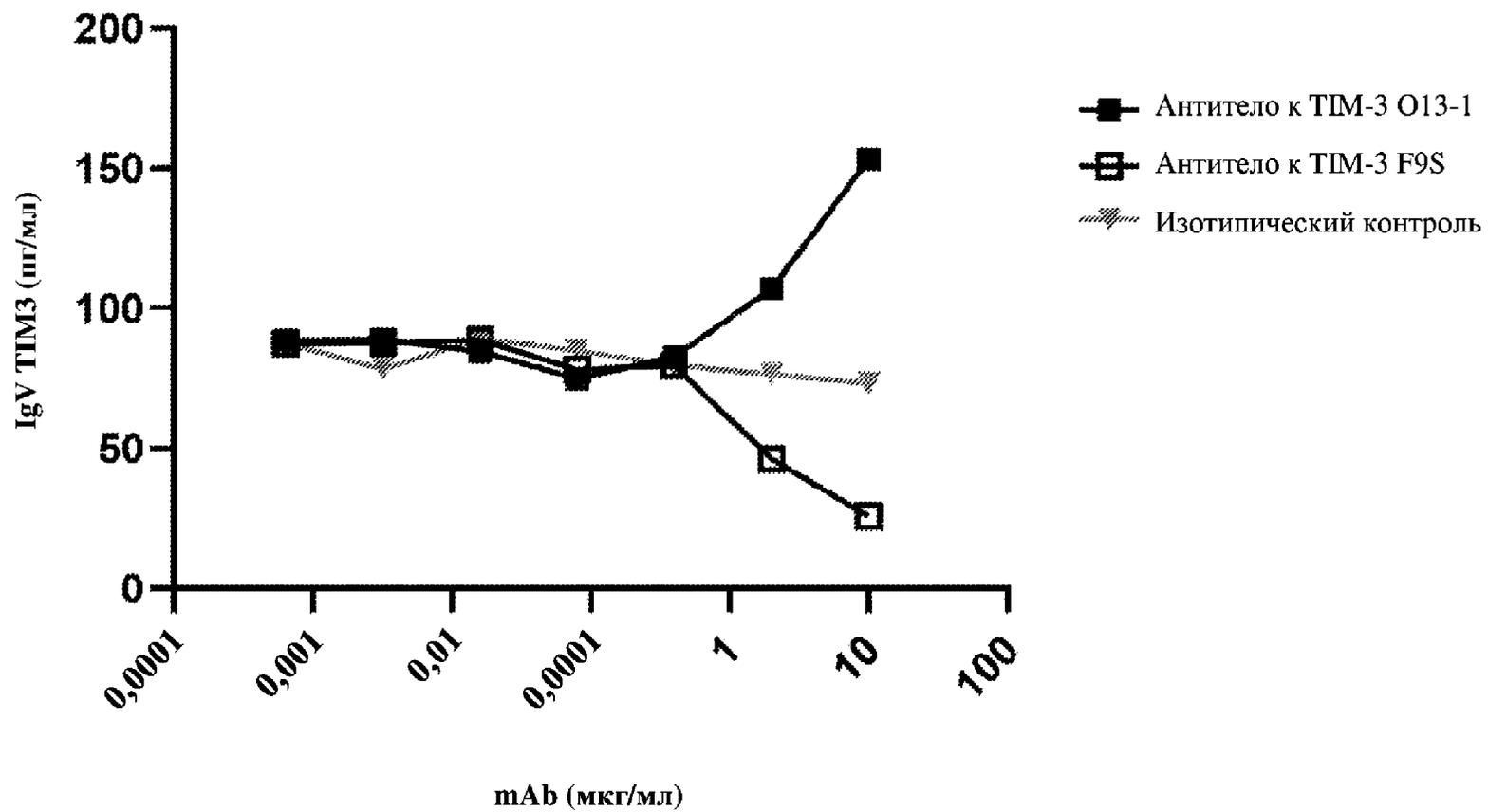
и где у субъекта имеется приобретенная резистентность к Ю.

47. Способ по п. 45 или п. 46, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с петлями C'С" и DE в IgV-домене TIM-3.

48. Способ по п. 45 или п. 46, где TIM-3-связывающий домен специфически связывается с эпитопами на IgV-домене TIM-3, и эпитопы содержат N12, L47, R52, D53, V54, N55, Y56, W57, W62, L63, N64, G65, D66, F67, R68, K69, D71, T75 и E77 из TIM-3 (SEQ ID NO: 29).

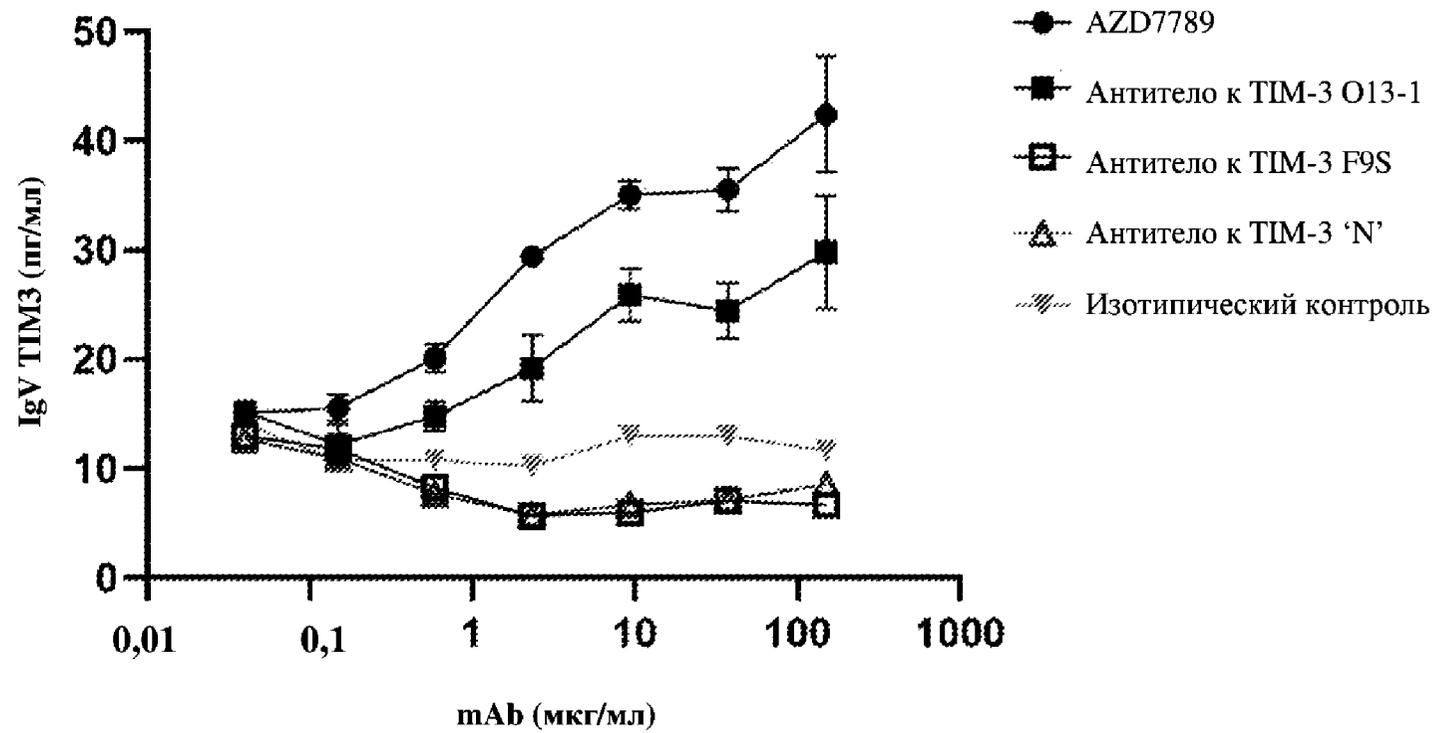
49. Способ по любому из пп. 45-48, где NSCLC представляет собой плоскоклеточную или неплоскоклеточную NSCLC.

ELISA для определения взаимодействия TIM-3/фосфатидилсерин



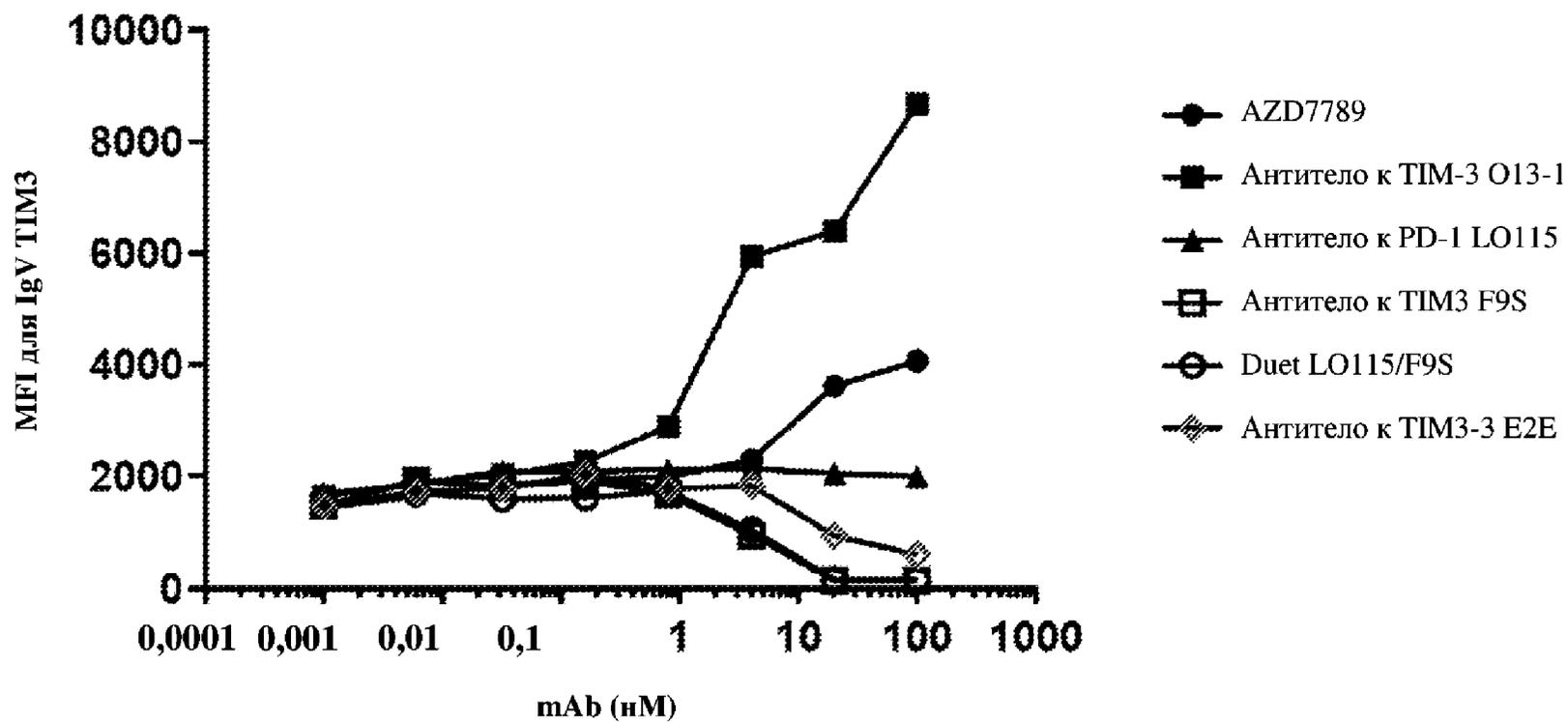
Фиг. 1А

ELISA для определения взаимодействия TIM-3/фосфатидилсерин



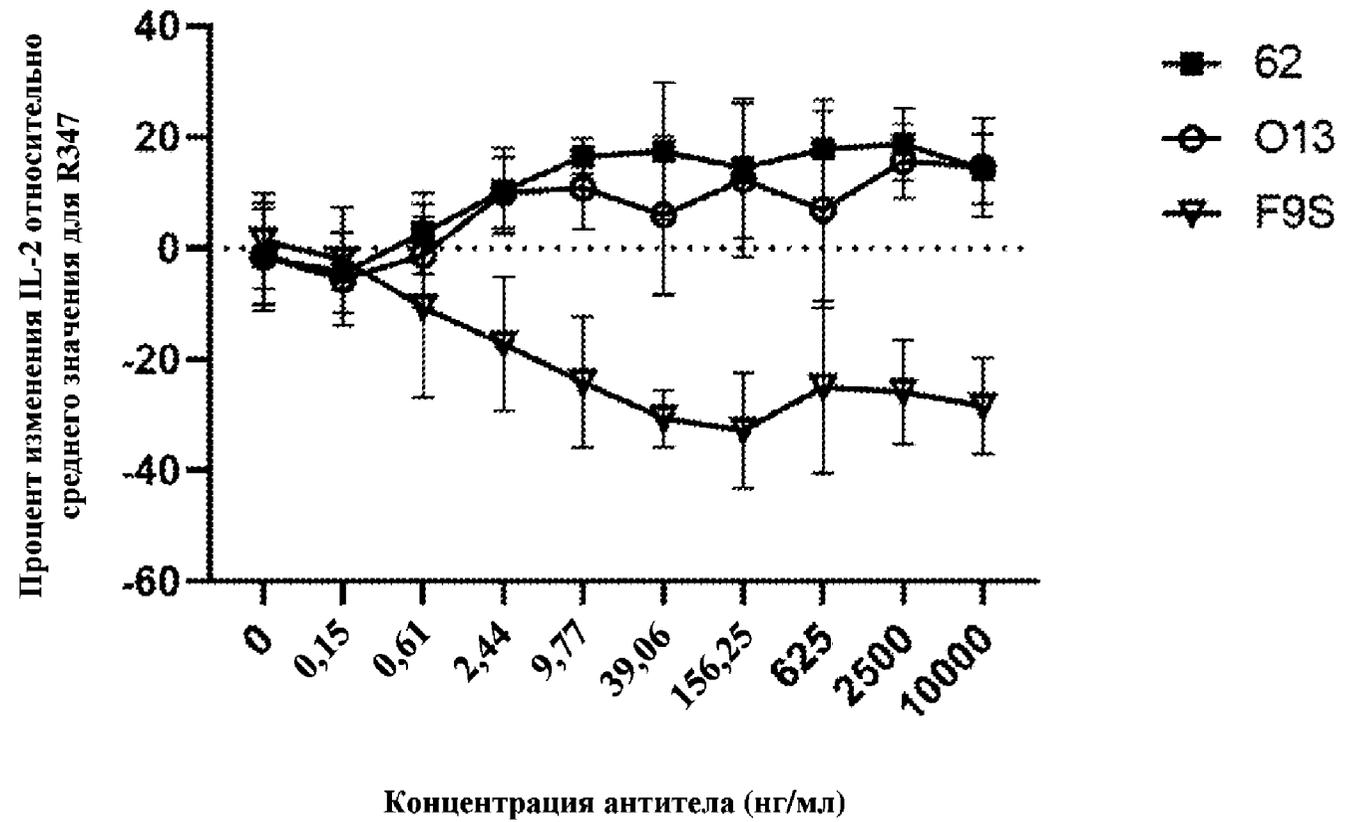
Фиг. 1В

Связывание TIM-3/фосфатидилсерин на апоптотических
клетках A375



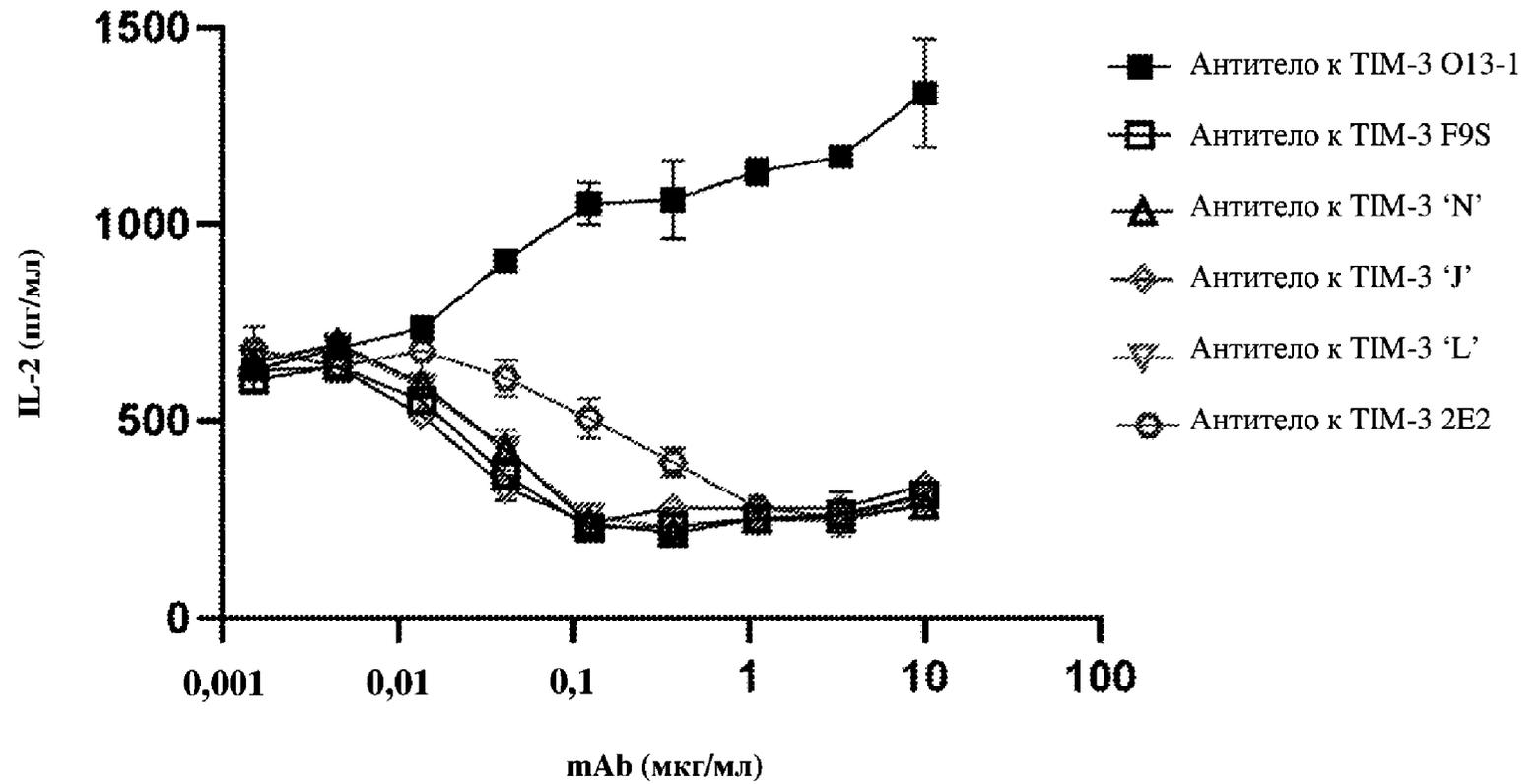
Фиг. 2

Уровень IL-2 после стимуляции клеток Jurkat-TIM3 антителами к CD3/CD28

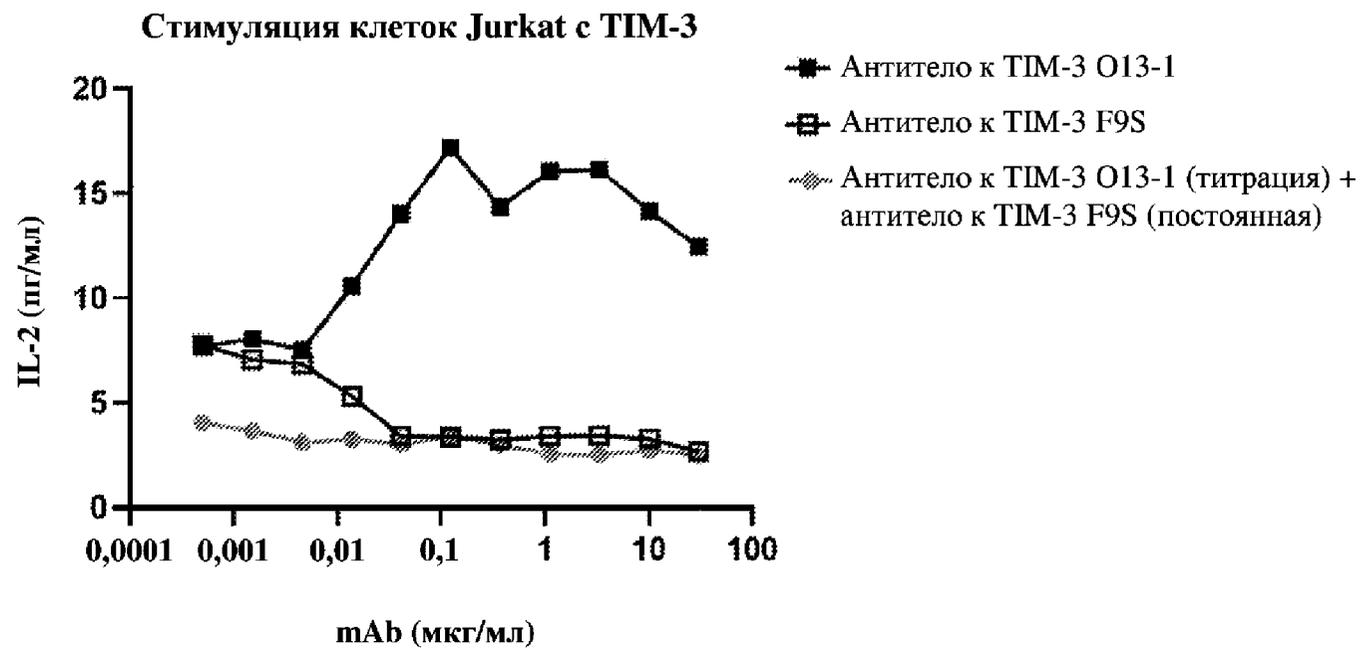


Фиг. 3

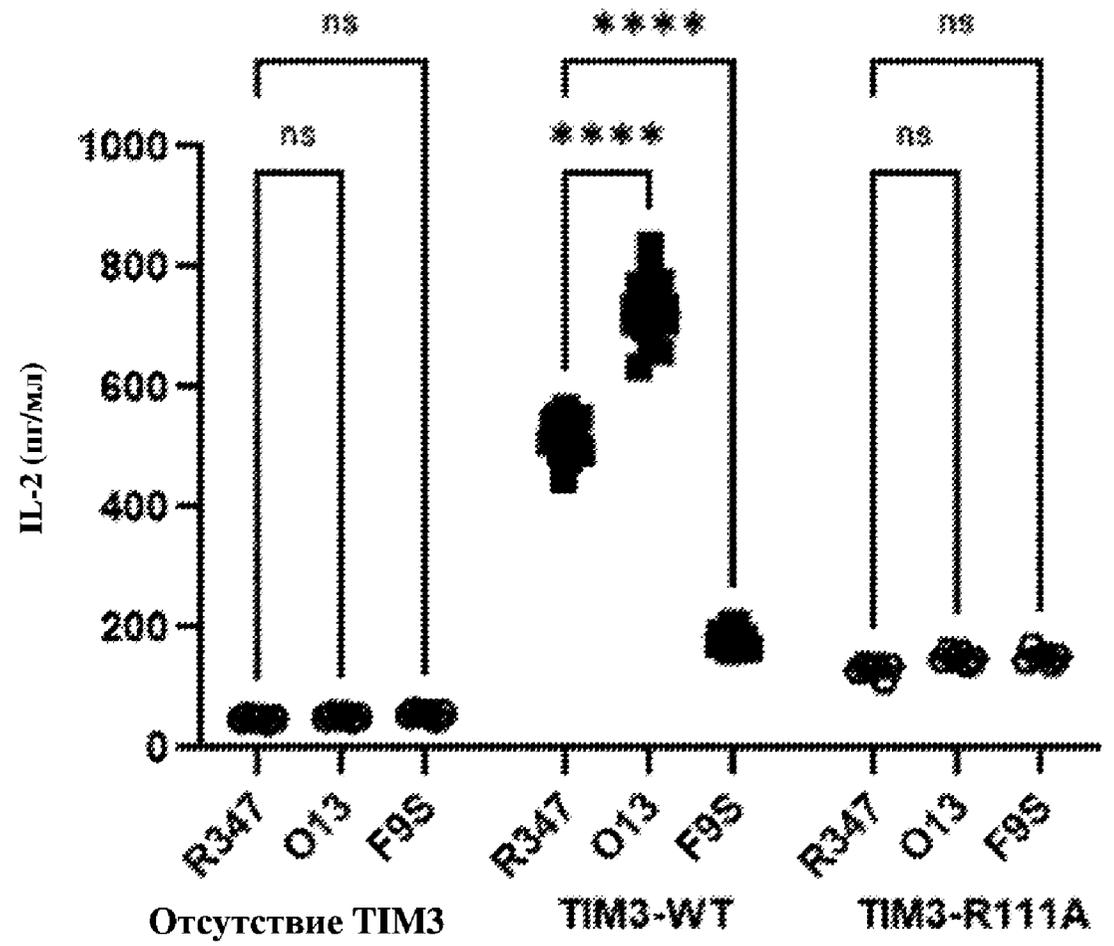
Клетки Jurkat с TIM-3
растворимые α CD3 α CD28



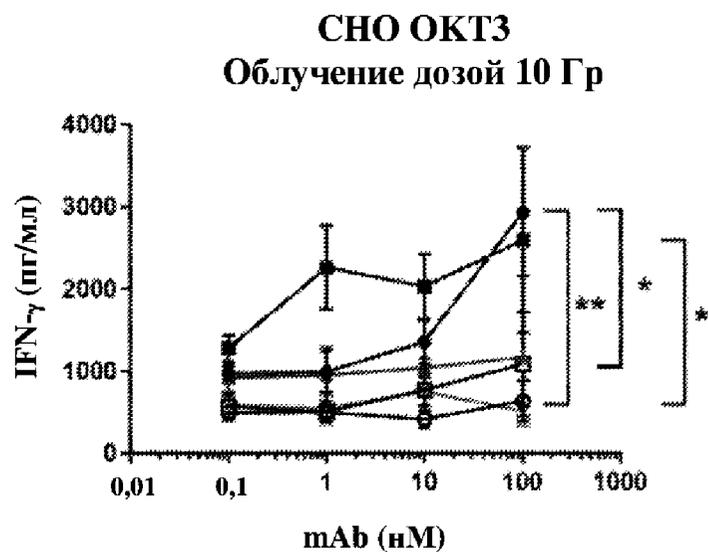
Фиг. 4



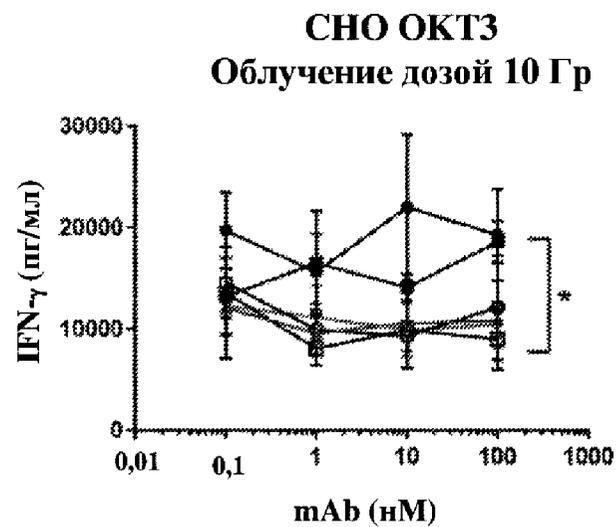
Фиг. 5



Фиг. 6



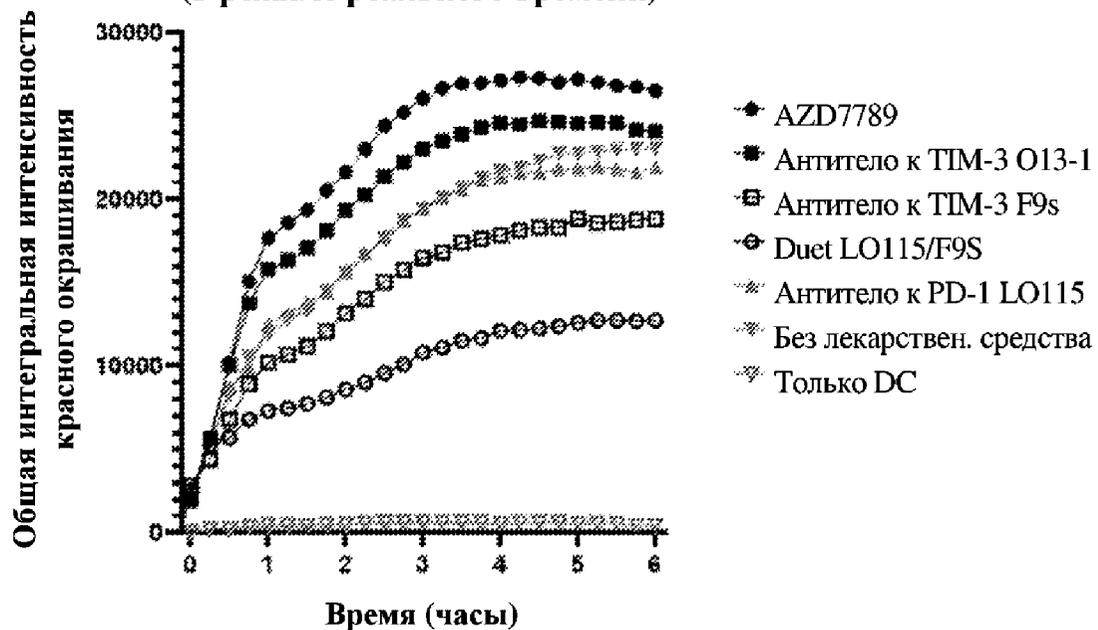
Фиг. 7А



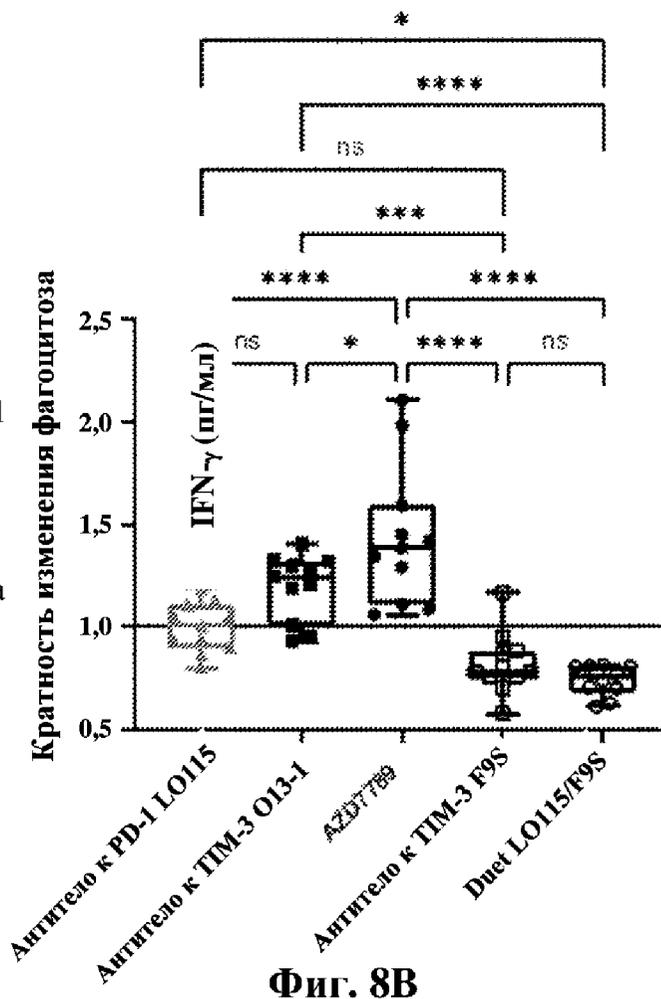
Фиг. 7В

- ◆ AZD7789
- ◆ Антитело к TIM-3 O13-1
- ◆ Антитело к PD-1 LO115
- ◆ Антитело к TIM-3 F9S
- ◆ Duet LO115/F9S
- ◆ Изотипический контроль

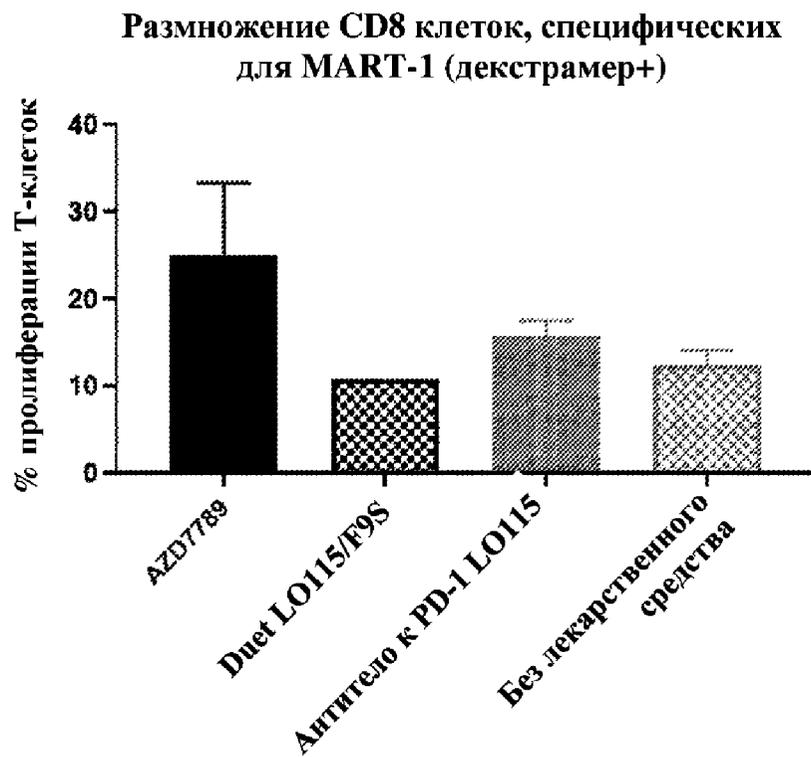
DC-эффероцитоз апоптотических клеток Jurkat
(в режиме реального времени)



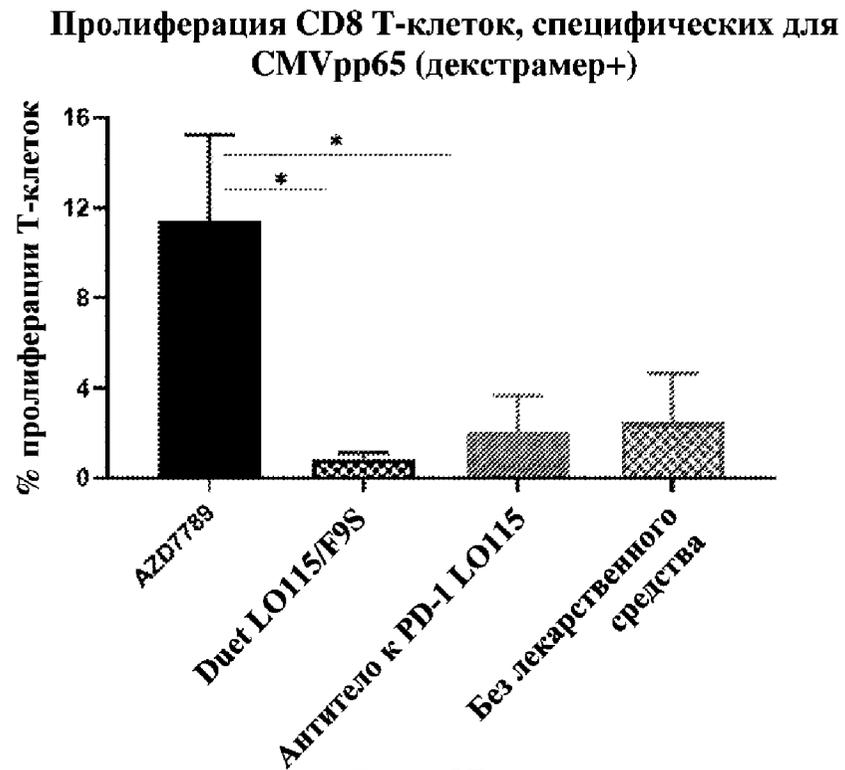
Фиг. 8А



Фиг. 8В

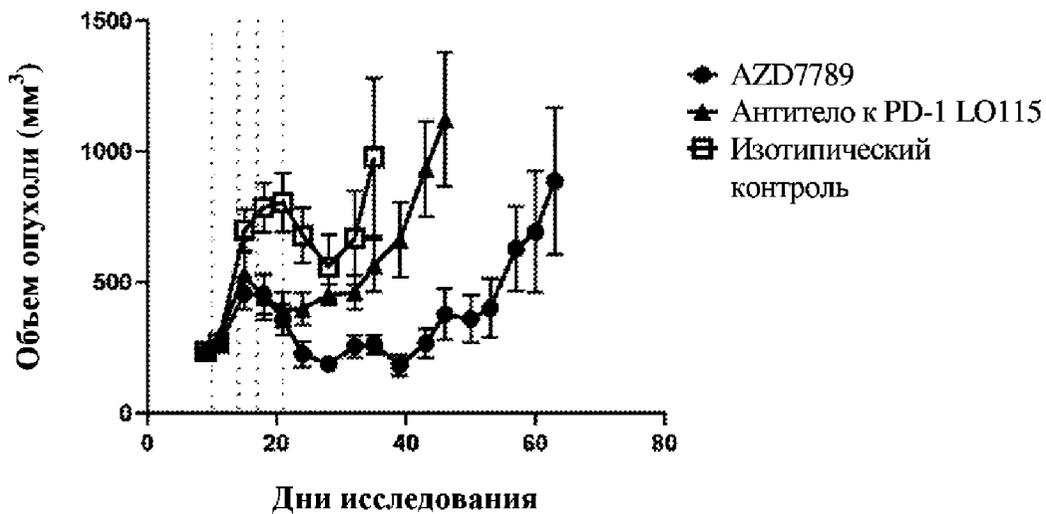


Фиг. 9А



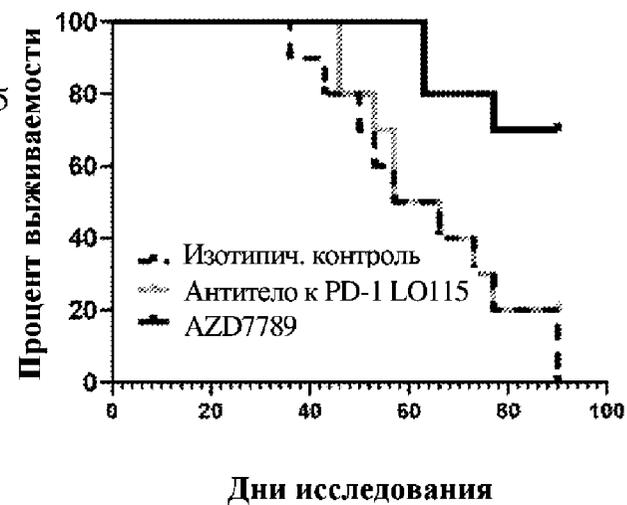
Фиг. 9В

AZD7789 увеличивает продолжительность ответа на гуманизированной мышинной модели опухоли

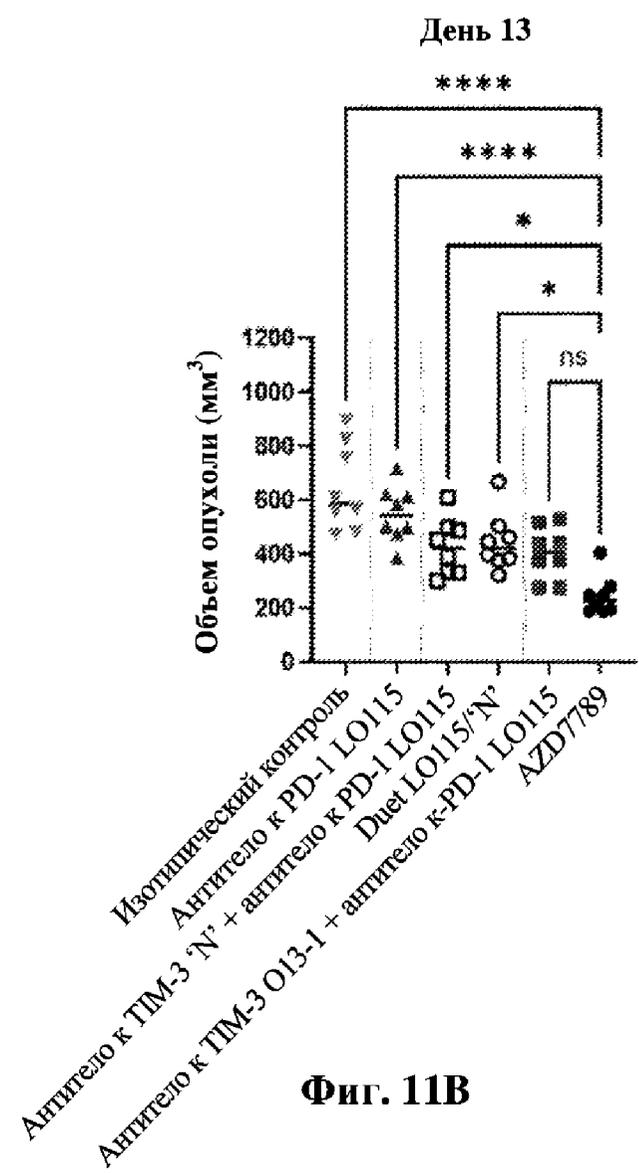
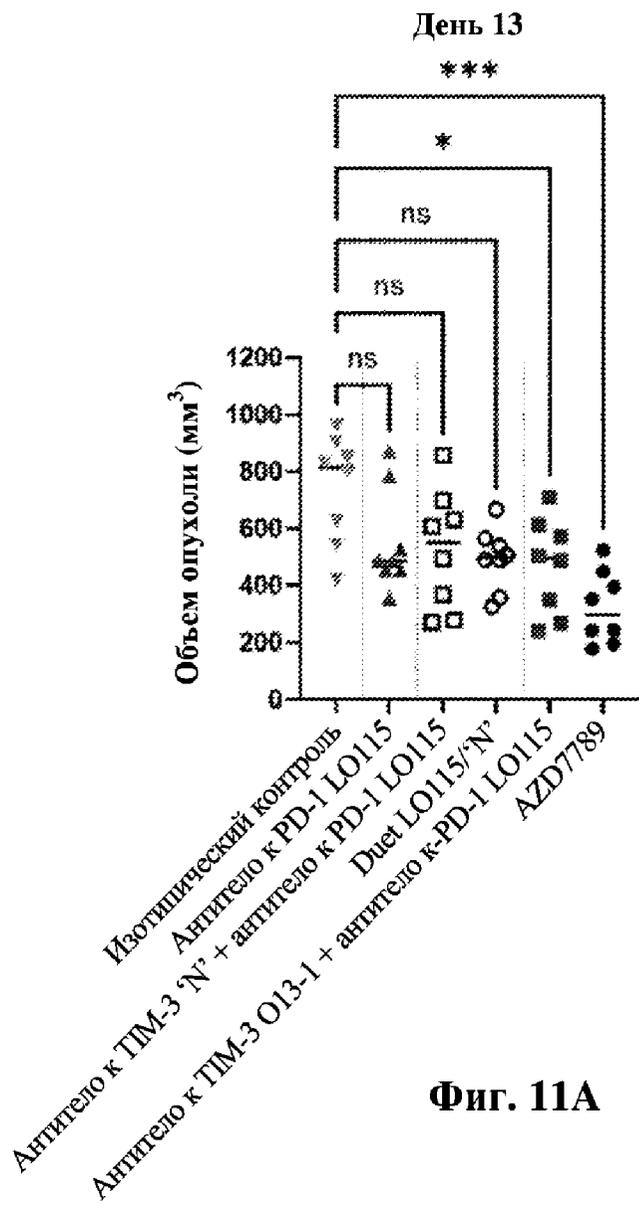


Фиг. 10А

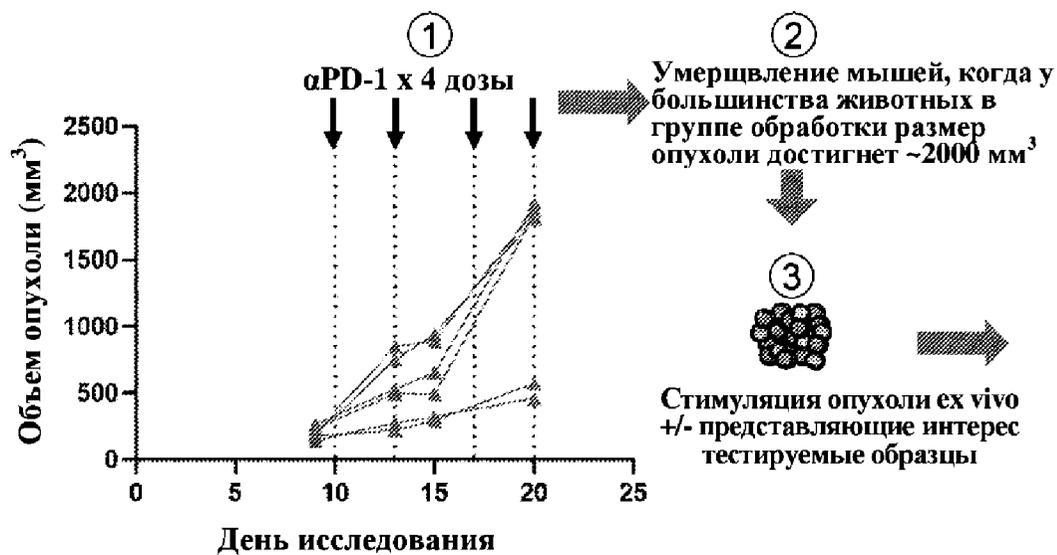
AZD7789 повышает выживаемость по сравнению с антителом к PD-1



Фиг. 10В

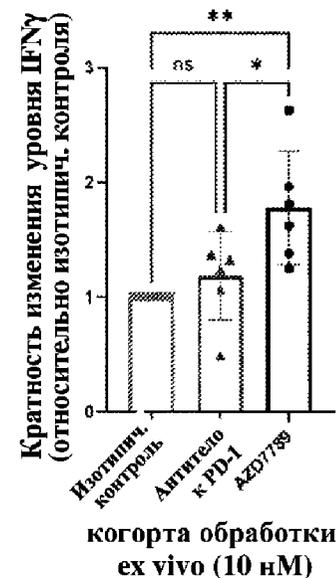


гуманизированная мышиная модель



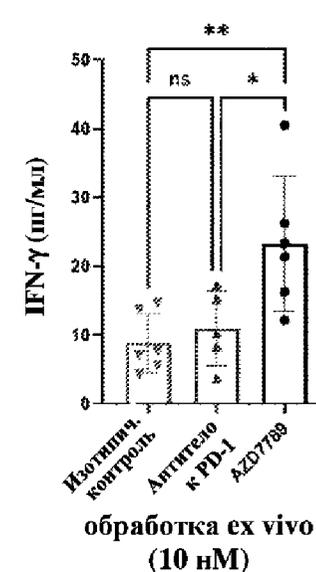
Фиг. 12А

Мыши, обработанные антителом к PD-1 in vivo
Стимуляция ex vivo



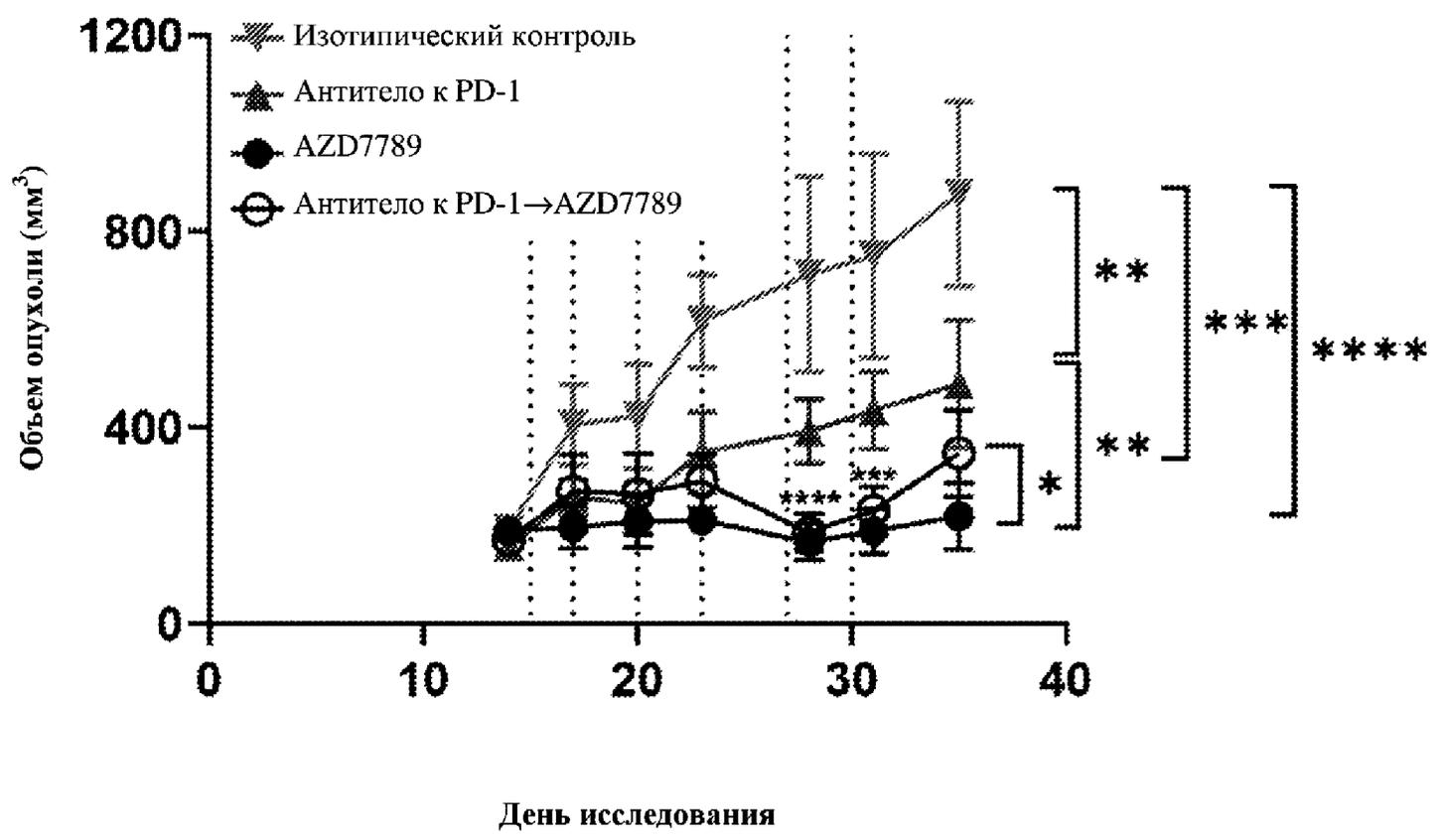
Фиг. 12В

Обработка антителом к PD-1 in vivo
мышь № 4

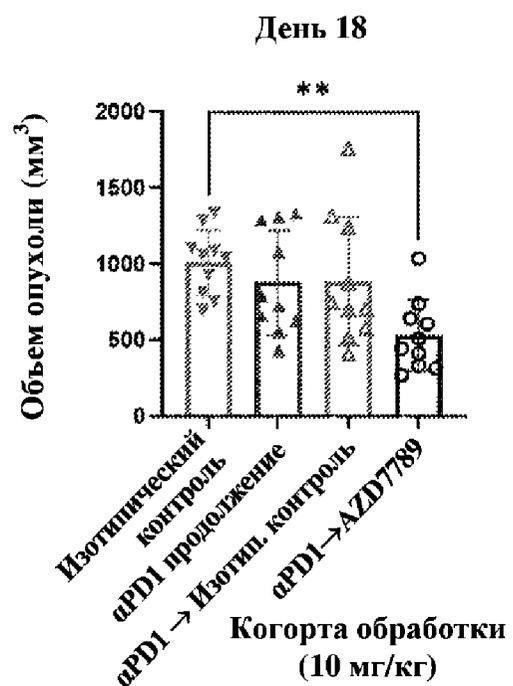


Фиг. 12С

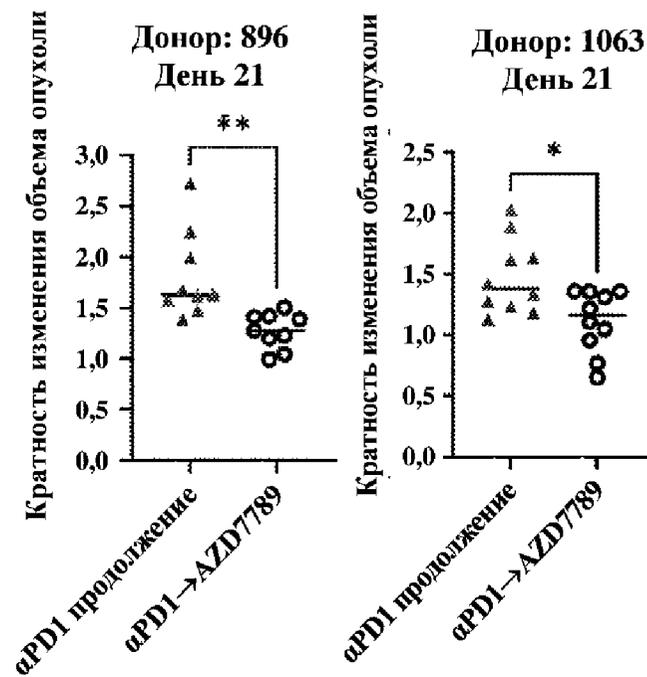
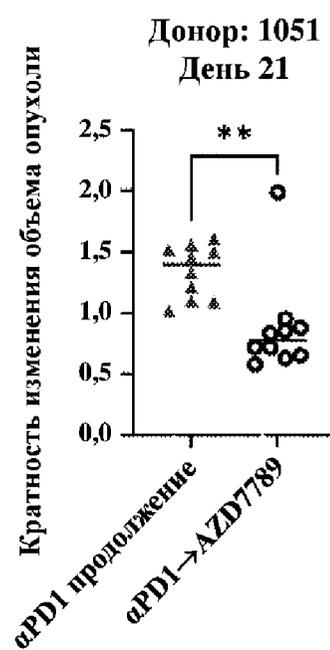
PC9-MART1



Фиг. 13А

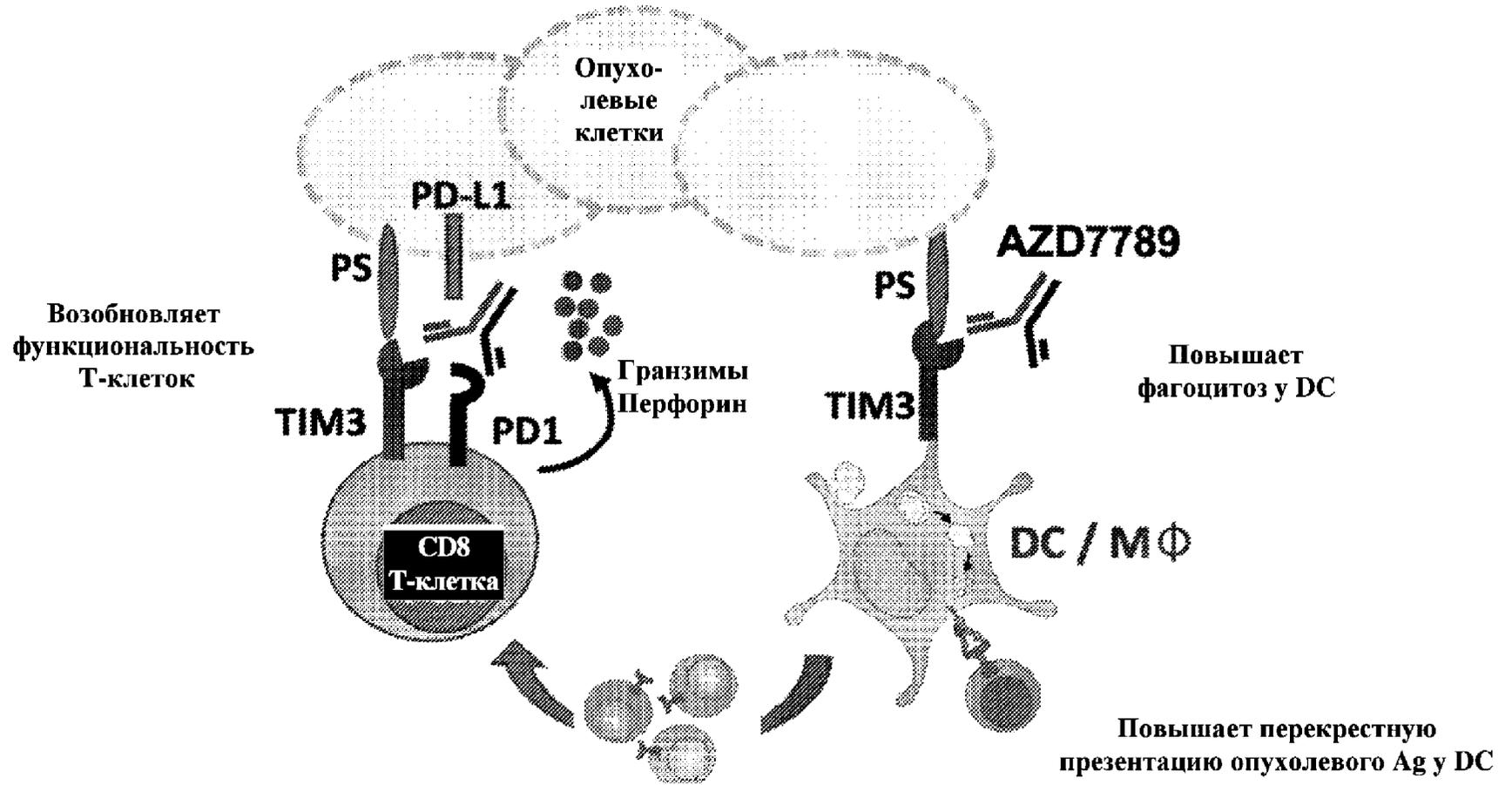


Фиг. 13В



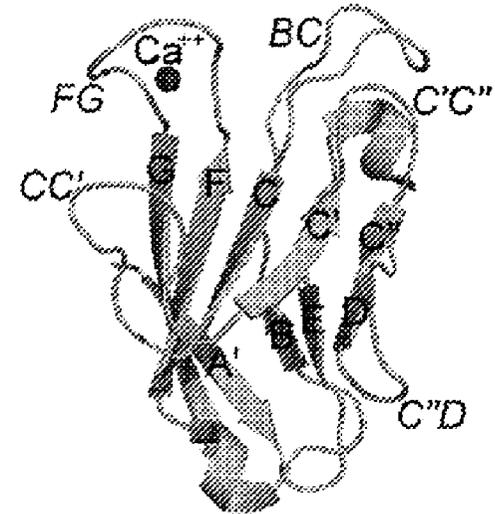
Фиг. 13С

AZD7789 модулирует различные субпопуляции клеток со стимулированием противоопухолевого ответа

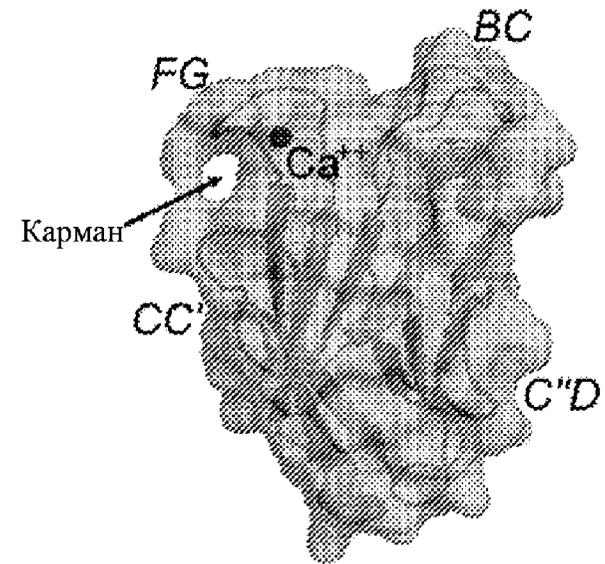


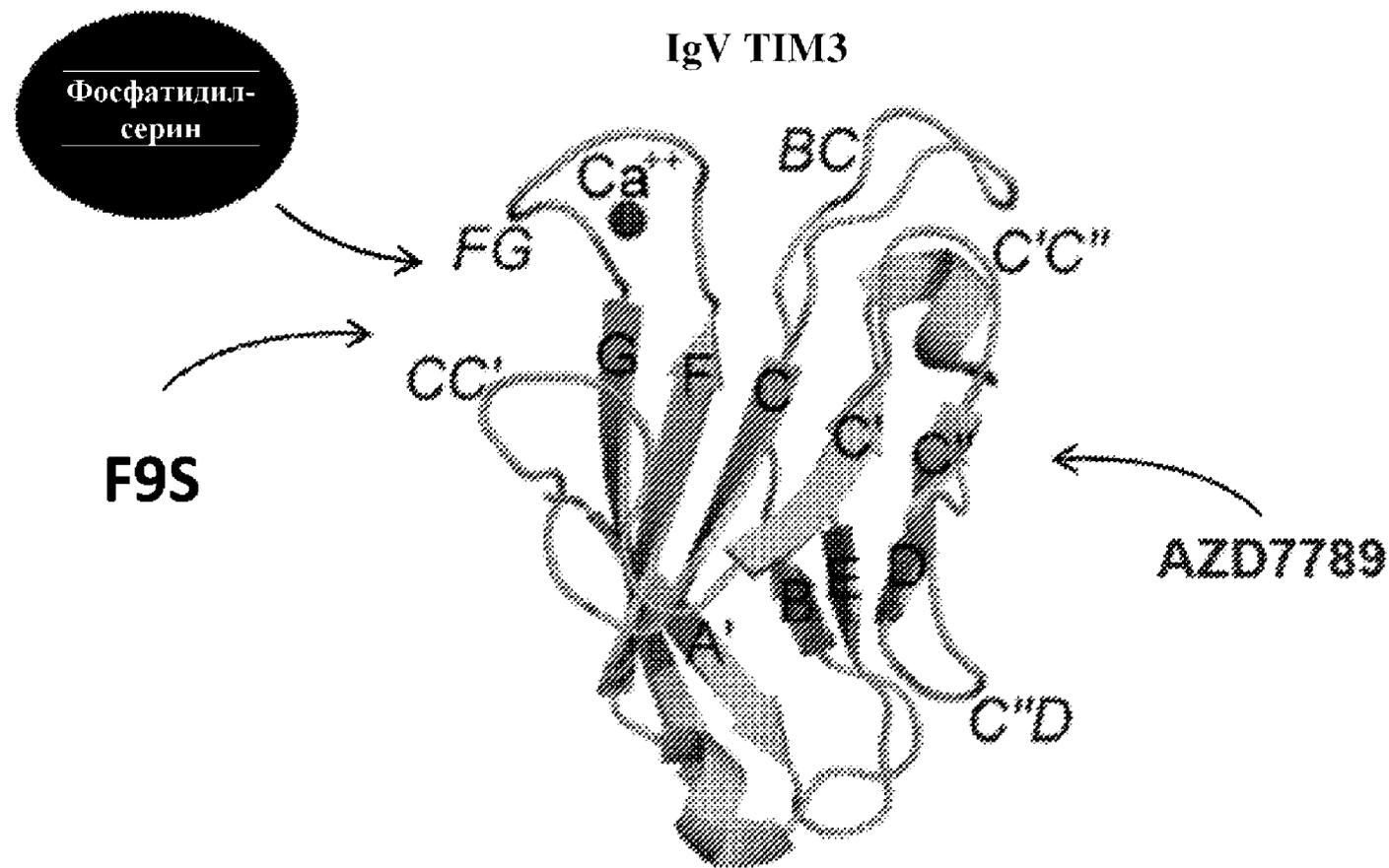
Фиг. 14

Фиг. 15А



Фиг. 15В



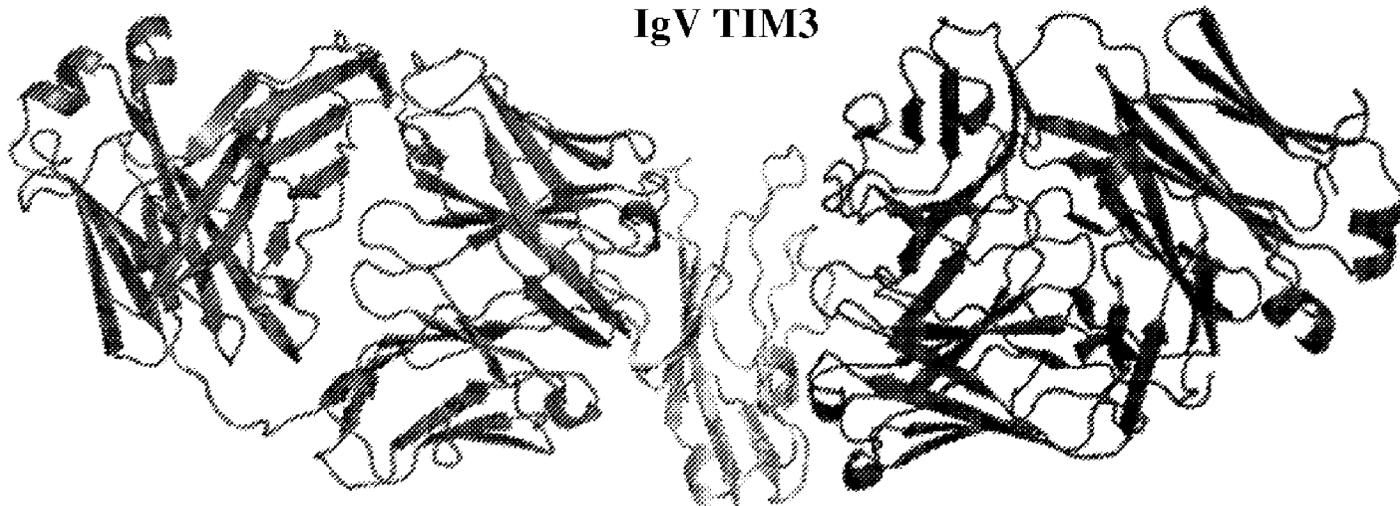


Фиг. 16А

F9S

IgV TIM3

AZD7789



Фиг. 16В