

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046196**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202290823

(22) Дата подачи заявки
2020.09.18

(54) **ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ LILRB2**

(31) **19306148.8**

(32) **2019.09.20**

(33) **EP**

(43) **2022.06.14**

(86) **PCT/EP2020/076198**

(87) **WO 2021/053199 2021.03.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНВЕКТИС САС (FR)

(72) Изобретатель:
Лусто Мария, Юно Лиз, Ланглад-Демуайен Пьер, Комартэн Жюльен (FR)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A1-2019144052**
WO-A2-2019126514
WO-A2-2016111947
WO-A1-2008142165

Anonymous: "Data-sheet: Human LILRB2/CD85d/ILT4 Antibody Monoclonal Mouse IgG2A Clone # 287219 Catalog Number: MAB2078", 1 January 2016 (2016-01-01), pages 1-2, XP055555256, Retrieved from the Internet: URL: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/mab2078.pdf>, the whole document

ANONYMOUS: "Invitrogen Data sheet: CD85d (ILT4) Monoclonal Antibody (42D1), Functional Grade, eBioscience Catalog Number 16-5149-85", INTERNET CITATION, 1 January 2015 (2015-01-01), XP002788854, Retrieved from the Internet: URL: [https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/generatePdf?productName=CD85d%20\(ILT4\)&assayType=PRANT&detailed=true&productId=16-5149-85](https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/generatePdf?productName=CD85d%20(ILT4)&assayType=PRANT&detailed=true&productId=16-5149-85) [retrieved on 2019-02-11], the whole document

HUI-MING CHEN ET AL.: "Blocking immunoinhibitory receptor LILRB2 reprograms tumor-associated myeloid cells and promotes antitumor immunity", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 128, no. 12, 22 October 2018 (2018-10-22), pages 5647-5662, XP055554809, GB, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI97570, abstract; figures 1-7

(57) Изобретение относится к однодоменным антителам (sdAb), направленным против члена 2 подсемейства В лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRB2), фармацевтическим композициям, содержащим их, и их применению в диагностике и терапии.

046196
B1

046196
B1

Область техники

Изобретение относится к области иммунотерапии и иммунодиагностики. В данном изобретении предложены однодоменные антитела (sdAb), направленные против члена 2 лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора подсемейства В (LILRB2).

Уровень техники

Лейкоцитарные иммуноглобулиновые (Ig)-подобные рецепторы (LILBR) представляют собой ингибирующие рецепторы, цитоплазматический хвост которых состоит из ИТМ (иммунорецепторных тирозинных ингибирующих мотивов). В то время как LILRB1 экспрессируется на всех субпопуляциях иммунных клеток, экспрессия LILRB2 ограничивается антигенпрезентирующими клетками (АРС), такими как моноциты, дендритные клетки и макрофаги.

LILRB2 взаимодействует с CD1d, несколькими молекулами каскада комплемента (C4d, C3d, C4b, C3b и iC3b), ангиопэтиноподобными белками 2 и 5 (ANGPTL2/5), В-амилоидами 1-42 и ингибиторами миелинового происхождения (Nogo66, MAG) и либо с классическими (HLA-A, -В и -С), либо с неклассическими молекулами ГКГС I класса (HLA-E, F и G). В частности, было продемонстрировано, что взаимодействие между LILRB2 и HLA-G, экспрессируемым на иммунных клетках, ингибирует клеточные функции и может индуцировать иммуносупрессивные клетки. Действительно, взаимодействие между HLA-G и LILRB2, присутствующими в дендритных клетках (ДК), ингибирует их созревание и делает их толерогенными.

Интересно, что рецептор LILRB2 экспрессируется при нескольких типах рака и часто связан с метастазированием. Хотя LILRB2 является ингибирующим рецептором, было показано, что его экспрессия в опухолях увеличивает пролиферацию и подвижность опухолевых клеток. Действительно, при связывании с HLA-G или ANGPTL2 рецептор LILRB2 ингибирует пути, подавляющие пролиферацию, рост и диссеминацию опухолевых клеток. Примечательно, что LILRB2 экспрессируется опухолеассоциированными макрофагами (ТАМ), особенно при солидных опухолях. Эти макрофаги демонстрируют фенотип M2, который связан с ингибированием инфильтрации иммунных клеток и функциями, способствующими пролиферации раковых клеток. Поскольку экспрессия рецептора LILRB2 ограничена АРС у здоровых людей, его неэкспрессия в опухолях и его сильная активация толерогенными DC и ТАМ делает рецептор LILRB2 превосходным антигеном, ассоциированным с опухолью (ТАА), для иммунотерапевтического лечения.

Однако на сегодняшний день отсутствуют эффективные иммунотерапевтические средства, способные блокировать LILRB2. Создание блокирующих моноклональных антител (mAb) к LILRB2 проложит путь к новым иммунотерапевтическим способам лечения. Тем не менее большой размер mAb (~150 кДа) является основным недостатком, поскольку он препятствует их проникновению в опухоль и, следовательно, ограничивает их применение для лечения солидных раков, которые по-прежнему остаются наиболее тяжело поддающимися лечению видами рака. Таким образом, в данной области техники остается значительная потребность в новых и улучшенных агентах для воздействия на такие виды рака.

Представители Camelidae естественным образом продуцируют различные классы антител: (i) обычные антитела с тяжелой цепью, содержащие две легкие и две тяжелые цепи (~150 кДа), (ii) гомодимерные антитела с тяжелой цепью, содержащие только Н-цепи (HcAb; ~95 кДа) и (iii) дополнительные изоформы IgG на основе уникальной тяжелой цепи. Эти антитела, содержащие только тяжелые цепи, продемонстрировали высокую аффинность связывания и специфичность к своему антигену, как и обычные mAb.

Вариабельный домен тяжелой цепи из HcAb (т.е. однодоменные антитела (sdAb) или Nanobodies® (Nb)) отвечает за связывание антигена и специфичность и может быть выделен из HcAb без потери их связывающих свойств. Их небольшой размер, обычно около 15-20 кДа, является важным преимуществом при нацеливании на солидные опухоли. Фактически, они должны иметь возможность более эффективно проникать в волокнистую микросреду, окружающую раковые клетки, и достигать клеток-мишеней, таких как макрофаги, осевшие в этой строме. Затем sdAb являются отличными кандидатами в контексте нацеливания на рецепторы LILRB2, присутствующие на солидных опухолях и ТАМ.

В настоящее время изобретатели внесли значительный технический вклад в разработку однодоменных антител к LILRB2 (sdAb).

Сущность изобретения

Изобретение относится к однодоменному антителу (sdAb), которое специфически связывается или специфически распознает члена 2 лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора подсемейства В (LILRB2), предпочтительно LILRB2 человека.

Предпочтительно указанное sdAb к LILRB2 не связывается с членом 1 лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора подсемейства В (LILRB1), предпочтительно с LILRB1 человека.

В одном аспекте sdAb по изобретению содержит по меньшей мере одну область, определяющую комплементарность (CDR), которая содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 или 33, или содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая отличается от SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 или 33 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций.

торая отличается от SEQ ID NO: 27 по причине одной, двух, трех или четырех аминокислотных модификаций; или

(j) CDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 28 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 28 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций, и

CDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 29 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 29 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций, и

CDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 30 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 30 по причине одной, двух, трех или четырех аминокислотных модификаций; или

(k) CDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 31 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 31 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций, и

CDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 32 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 32 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций, и

CDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 33 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 33 по причине одной, двух, трех или четырех аминокислотных модификаций.

В частности, sdAb к LILRB2 содержит три CDR, где CDR1 содержит или представляет собой SEQ ID NO: 1, а CDR2 содержит или представляет собой SEQ ID NO: 2, а CDR3 содержит или представляет собой SEQ ID NO: 3.

В конкретном аспекте sdAb к LILRB2 содержит или состоит из последовательности, определенной в любой из последовательностей от SEQ ID NO: 34 до SEQ ID NO: 44, или последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности.

В частности, sdAb к LILRB2 содержит или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO: 34.

Предпочтительно sdAb к LILRB2 по изобретению ингибирует взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G) и/или взаимодействие между LILRB2 и ангиоподобным белком 2 (ANGPTL2).

В другом аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую sdAb к LILRB2 по изобретению, предпочтительно определяемую последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID: 45-55.

Изобретение также относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту по данному изобретению, а также к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему sdAb или выделенную нуклеиновую кислоту по данному изобретению.

В конкретном аспекте изобретение относится к клетке, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению или экспрессирующей CAR, описанный в данном документе. Предпочтительно клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, моноциты и дендритные клетки, предпочтительно клетка представляет собой Т-клетку, В-клетку или NK-клетку.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей sdAb, выделенную нуклеиновую кислоту, вектор, CAR или клетку, экспрессирующую CAR по изобретению, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте sdAb, выделенная нуклеиновая кислота, вектор, CAR, клетка или фармацевтическая композиция по изобретению предназначены для применения при лечении рака, предпочтительно при котором рак сверхэкспрессирует LILRB2, более предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака поджелудочной железы, протоковой карциномы поджелудочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рака яичников, рака молочной железы, колоректального рака, глиомы, рака желудка, рака почки, рака яичка, рака пищевода, рака шейки матки, рака легкого Льюиса у мышей, лейкемии, рака щитовидной железы, рака печени, уротелиального рака и рака головы и шеи.

Наконец, изобретение относится к применению sdAb к LILRB2 по изобретению для обнаружения LILRB2 на опухолевых клетках или тканях *in vitro* или *ex vivo*.

Фигуры

Фиг. 1. Иммунизация альпаки и определение специфичности VHH. А) Протокол иммунизации альпаки белками rhLILRB2-Fc. В) Сыворотку иммунизированной альпаки тестировали с помощью ИФА в различных разведениях. С) Отбор VHH проводили с использованием векторов для фагового дисплея и техники биопэннинга и оценивали по сравнению с rhLILRB2-Fc. Положительные антитела VHH к LILRB2 обведены сплошной линией, а отрицательные - пунктирной линией.

Фиг. 2. Nb B8, C7 и C9 распознают линейные эпитопы rhLILRB2. Денатурированные белки rhLILRB2-Fc (rhILT4-Fc), rhLILRB2 (rhILT4) и rhLILRB1 (rhILT2) переносили на мембраны с помощью вестерн-блоттинга. А) Белки rhLILRB2-Fc, rhLILRB2 и rhLILRB1 инкубировали с контрольными антите-

лами к LILRB2 (H-300 и 42D1), контрольными антителами к LILRB1 (GHI/75 и HP-F1). В) Белки rhLILRB2-Fc, rhLILRB2 и rhLILRB1 инкубировали с Nb B8, C7 и C9. Связывание антител определяли с использованием меченных HRP козжих антикрысиных антител к H-300 и меченных HRP козжих антимышинных антител к 42D1, GHI/75 и HP-F1, а также меченных HRP мышинных антител к с-Мус, мечаящих Nb.

Фиг. 3. Связывание Nb (B8, C7, C9) с денатурированным rhILT4 (домены D1-D4) и отсутствие или связывание Nb (B8, C7, C9) с денатурированным rhILT2 (D1-D4).

Фиг. 4. Специфичность Nb для трансдуцированной LILRB2 клеточной линии D1.1. Линию клеток LILRB2 D1.1 совместно инкубировали с контрольным антителом 42D1 или антителом Nb к LILRB2 и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 5. Специфичность Nb в отношении рецепторов LILRB2 на моноцитах из PBMC. Моноциты выделяли из PBMC, а затем окрашивали на экспрессию рецепторов LILRB2 с помощью контрольного антитела 42D1 и Nb по сравнению с нерелевантным контрольным Nb и анализировали с помощью проточной цитометрии. Моноциты идентифицировали от других лейкоцитов с помощью антител к CD14 и к LILRB1.

Фиг. 6. Блокирующая способность антител Nb к LILRB2 против взаимодействия LILRB2/HLA-G6. Как показано на панели дизайна исследования (вверху справа), планшеты для микротитрования покрывали белком rhLILRB2-Fc перед совместной инкубацией с отдельными Nb. Затем добавляли белок V5, меченый HLA-G6, и определяли белок HLA-G6-V5 с использованием HRP-конъюгированных антител Ab к V5. Значения нормализовали по средней интенсивности поглощения отрицательного контроля (rhLILRB2-Fc инкубировали только с белком HLA-G6-V5 в отсутствие Nb или контрольного Ab) (n=3).

Фиг. 7. Блокирующая способность антител Nb к LILRB2 против взаимодействия LILRB2/ANGPTL2. Как показано на панели дизайна исследования (вверху справа), планшеты для микротитрования покрывали белком rhLILRB2-Fc перед совместной инкубацией с отдельными Nb. Затем добавляли белок ANGPTL2 и проводили обнаружение ANGPTL2 с использованием очищенного антитела к ANGPTL2, а затем конъюгированного с HRP антитела к кроличьему Ab. Значения нормализовали по средней интенсивности поглощения (MFI) отрицательного контроля (rhLILRB2-Fc инкубировали только с белком ANGPTL2 в отсутствие Nb или контрольного Ab (n=1).

Подробное описание изобретения

Определения

Используемый в данном документе термин "член 2 лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора подсемейства В" или "LILRB2" относится к члену семейства лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LIR), в частности к подсемейству В класса LIR-рецепторов, которые содержат два или четыре внеклеточных иммуноглобулиновых домена, трансмембранный домен и от двух до четырех цитоплазматических иммунорецепторных тирозиновых ингибиторных мотивов (ITIM). LILRB2 экспрессируется на иммунных клетках, где он связывается с молекулами ГКГС класса I на антигенпрезентирующих клетках и передает отрицательный сигнал, подавляющий стимуляцию иммунного ответа. Считается, что он контролирует воспалительные реакции и цитотоксичность, помогая сосредоточить иммунный ответ и ограничить аутореактивность. LILRB2 имеет известные альтернативные названия, такие как LIR2, CD85-антигенподобный член семейства D, CD85D, иммуноглобулинподобный транскрипт 4, ILT4, моноцитарно-макрофагальный иммуноглобулинподобный рецептор 10 или MIR-10. В контексте изобретения этот термин, в частности, относится к LILRB2 человека. LILRB2 человека известен в данной области техники, например, под номером доступа UniProt Q8N423. Например, аминокислотная последовательность LILRB2 человека состоит из около 598 аминокислот, при этом ген расположен в кластере на участке хромосомы 19q13.4. Человеческий LILRB2 имеет четыре известные изоформы, полученные путем альтернативного сплайсинга. Изоформа 1 была выбрана в качестве канонической последовательности и описана под номером доступа Uniprot Q8N423-1, изоформа 2 отличается от изоформы 1 делецией аминокислоты в положении 437 и описана под номером доступа Uniprot Q8N423-2, изоформа 3 отличается от изоформы 1 делецией аминокислоты в положениях 495-510 и 511-598 и описана под номером доступа Uniprot Q8N423-3, изоформа 4 отличается от изоформы 1 делецией аминокислот в положениях 1-116 и описана под номером доступа Uniprot Q8N423-4. В контексте изобретения термин "LILRB2" охватывает все изоформы LILRB2.

Используемый в данном документе термин "антитело, состоящее из тяжелых цепей" (HcAb) относится к иммуноглобулинам, которые лишены легких цепей и состоят из двух тяжелых цепей. Каждая тяжелая цепь содержит константную область (CH) и переменный домен (VH), которые обеспечивают связывание со специфическим антигеном, эпитопом или лигандом.

Используемый в данном документе термин "HcAb" охватывает антитела с тяжелой цепью типа верблюдовых, в которых каждая тяжелая цепь содержит переменный домен, называемый VHH, и два константных домена (CH2 и CH3). Следует отметить, что у верблюдовых HcAb отсутствует первый константный домен (CH1). Такие антитела, состоящие из тяжелых цепей, направленные против конкретного антигена, могут быть получены из иммунизированных животных верблюдовых.

Используемый в данном документе термин "верблюдовые" включает одногорбого верблюда, верб-

люда, ламу и альпаку. HcAb верблюдовых были описаны Hamers-Casterman et al., *Nature*, 1993, 363:446. Другими примерами HcAb являются иммуноглобулиноподобные структуры хрящевых рыб (Ig-NAR), таких как акула-нянька (*Ginglymostoma cirratum*) и ковровая акула (*Orectolobus maculatus*).

Используемый в данном документе термин "однодоменное антитело" (sdAb или Nb) относится к одновариабельному домену, полученному из антитела, содержащего только тяжелую цепь, которое способно связывать только антиген, эпитоп или лиганд, т.е. без необходимости в другом связывающем домене. Однодоменное антитело может происходить из V_HH или V-NAR или состоять из них. V_HH относится к вариабельному домену, обнаруженному в HcAb верблюдовых. V-NAR относится к вариабельному домену, обнаруженному в иммуноглобулиноподобных структурах (Ig-NAR), обнаруженных у хрящевых рыб. В качестве альтернативы однодоменное антитело можно получить из наивных синтетических библиотек. Для обзора однодоменных антител можно обратиться к Saerens et al., *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8:600-608, Muyldermans et al., *Vet Immunol. Immunopathol.* 2009 Mar 15; 128(1-3):178-83, и/или Muyldermans 2013, *Annu Rev. Biochem.* 2013; 82:775-97, раскрытие которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "связывать" или "связывание" относится к пептидам, полипептидам, белкам, слитым белкам и антителам (включая sdAb), которые распознают антиген и контактируют с ним. Под "специфическим связыванием" или "иммуноспецифическим связыванием" подразумевается, что антитело распознает специфический антиген, но по существу не распознает и не связывает другие молекулы или антигены в пробе. В некоторых случаях термины "специфическое связывание" или "специфично связывается" могут использоваться в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим веществом, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа). Используемый в данном документе термин "специфическое связывание" означает контакт между антителом и антигеном с аффинностью связывания по меньшей мере 10^{-6} или 10^{-7} M. В некоторых аспектах антитела связываются с аффинностью по меньшей мере около 10^{-8} M, предпочтительно 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} M.

Термины "sdAb, которые специфически связываются с LILRB2", и аналогичные термины, используемые в данном документе, относятся к sdAb, которые специфически распознают LILRB2 и не распознают или слабо распознают другие антигены (включая других членов семейства LILR, например, такие как LILRB1). Предпочтительно sdAb, которые специфически связываются с LILRB2, имеют более высокую аффинность к этому антигену по сравнению с аффинностью к другим антигенам или их фрагментам, включая других членов семейства LILR, например, таких как LILRB1, предпочтительно по меньшей мере в 10, 100 или 1000 раз.

Аффинность антитела или sdAb может быть мерой его связывания со специфическим антигеном в одном сайте антиген-антитело и, по сути, представляет собой сумму всех сил притяжения и отталкивания, присутствующих при взаимодействии между антигенсвязывающим участком антитела и конкретным эпитопом. Аффинность антитела или sdAb к определенному антигену (например, LILRB2) может быть выражена константой равновесия K диссоциации, определяемой уравнением $K_d = [Ag][Ab]/[Ag Ab]$, которое представляет собой аффинность сайта связывания антитела; где [Ag] представляет собой концентрацию свободного антигена (M), [Ab] представляет собой концентрацию свободного антитела (M) и [Ag Ab] представляет собой концентрацию (M) комплекса антиген-антитело. Там, где антиген и антитело или sdAb сильно взаимодействуют друг с другом, будет очень мало свободного антигена или свободного антитела или sdAb, и, следовательно, константа равновесия или аффинность антитела или sdAb будет низкой.

"Идентичность" "процентной идентичности" между двумя аминокислотными последовательностями (A) и (B) определяют путем сравнения двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, через окно сравнения. Указанное выравнивание последовательностей может быть осуществлено известными способами, например, с использованием алгоритма глобального выравнивания Нидлмана-Вунша. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя меры сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. После получения полного выравнивания можно получить процент идентичности путем деления полного числа идентичных аминокислотных остатков, выровненных, на полное количество остатков, содержащихся в самой длинной последовательности между последовательностями (A) и (B). Идентичность последовательности обычно определяют с помощью программного обеспечения для анализа последовательности. Для сравнения двух аминокислотных последовательностей можно использовать, например, инструмент "Emboss needle" для попарного выравнивания последовательностей белков, предоставляемый EMBL-EBI и доступный на: http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein, используя настройки по умолчанию: (i) матрица: BLOSUM62, (ii) открытие гэпа: 10, (iii) штраф за продолжение гэпа: 0.5, (iv) выходной формат: пара, (v) штраф за внесение концевого гэпа: ложное значение, (vi) открытый конечной гэп: 10, (vii) штраф за продолжение концевого гэпа: 0.5.

Используемый в данном документе термин "аминокислотная модификация" означает изменение аминокислотной последовательности полипептида. "Аминокислотные модификации", которые также

могут быть названы "аминокислотными заменами", в данном документе включают аминокислотные мутации, такие как замена, вставка и/или делеция в полипептидной последовательности. Под "аминокислотной заменой" или "заменой" в данном документе подразумевается замена аминокислоты в конкретном положении в последовательности исходного полипептида другой аминокислотой. Предпочтительно замены представляют собой молчащие замены. Под "вставкой аминокислоты" или "вставкой" подразумевается добавление аминокислоты в конкретное положение в исходной полипептидной последовательности. Под "аминокислотной делецией" или "делецией" подразумевается удаление аминокислоты в конкретном положении в исходной полипептидной последовательности. Аминокислотные замены могут быть консервативными. Консервативная замена представляет собой замену данного аминокислотного остатка другим остатком, имеющим боковую цепь ("R-группу") с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом, объемом и/или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. Консервативные замены и соответствующие правила хорошо описаны в уровне техники.

Используемый в данном документе термин "исходный полипептид" или "родительский полипептид" относится к немодифицированному полипептиду, который впоследствии модифицируют для получения его варианта. В контексте изобретения исходный полипептид может представлять собой VHH природного HcAb.

В контексте данного документа термин "вариантный белок", или "вариант белка", или "вариант" в данном контексте относится к последовательности полипептида, которая отличается от последовательности исходного полипептида благодаря по меньшей мере одной аминокислотной модификации. Например, в контексте изобретения вариант может представлять собой вариант VHH природного HcAb. Обычно вариант содержит от 1 до 50 модификаций аминокислот, предпочтительно от 1 до 40 модификаций аминокислот. В частности, вариант может иметь от 1 до 30 аминокислотных замен, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен по сравнению с исходным вариантом. Варианты могут содержать одну или более аминокислотных замен, и/или одну или более аминокислотных вставок, и/или одну или более аминокислотных делеций. В некоторых вариантах осуществления вариант может содержать одну или более консервативных замен, например как показано выше. В некоторых дополнительных вариантах осуществления вариант sdAb может содержать одну или более аминокислотных модификаций в доменах CDR исходного sdAb. Поскольку CDR3 обычно используется для определения семейств sdAb с одинаковым паттерном распознавания, такие модификации в CDR3 могут привести к тому, что новое семейство sdAb будет обладать отличными свойствами связывания (например, повышенным свойством связывания) по сравнению с родительским sdAb, тогда как модификации в CDR1 или CDR2 может привести к определению разных членов одного и того же семейства (т.е. имеющих одинаковую CDR3, но разные CDR1 и/или CDR2). В некоторых других вариантах осуществления вариант исходного sdAb может содержать одну или более аминокислотных модификаций по меньшей мере в одном каркасном домене.

Термин "лечение" относится к любому действию, направленному на улучшение состояния здоровья пациентов, такому как терапия, предотвращение, профилактика и замедление течения заболевания или симптомов заболевания. Он обозначает как лечебное лечение, так и/или профилактическое лечение заболевания. Лечебное лечение определяется как лечение, приводящее к излечению, или лечение, облегчающее, улучшающее и/или устраняющее, уменьшающее и/или стабилизирующее заболевание или симптомы заболевания или страдания, которые оно прямо или косвенно вызывает. Профилактическое лечение включает как лечение, приводящее к предотвращению заболевания, так и лечение, уменьшающее и/или замедляющее прогрессирование и/или частоту возникновения заболевания или риск его возникновения. В некоторых вариантах осуществления такой термин относится к улучшению или устранению заболевания, расстройства, инфекции или симптомов, связанных с ними. В других вариантах осуществления этот термин относится к минимизации распространения или ухудшения состояния при раке. Лечение по данному изобретению не обязательно подразумевает 100% или полное лечение. Скорее, существуют различные степени лечения, которые специалисты в данной области техники расценивают как имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект.

Используемый в данном документе термин "расстройство" или "заболевание" относится к неправильно функционирующему органу, части, структуре или системе организма в результате воздействия генетических ошибок или ошибок развития, инфекции, ядов, дефицита или дисбаланса питания, токсичности, или неблагоприятных факторов окружающей среды. Предпочтительно эти термины относятся к расстройству здоровья или заболеванию, например болезни, которая нарушает нормальные физические или психические функции. Более предпочтительно термин "расстройство" относится к иммунным и/или воспалительным заболеваниям, поражающим животных и/или людей, таким как рак.

Используемый в данном документе термин "рак" определяется как заболевание, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела, например метастазируя.

Используемый в данном документе термин "субъект", "хозяин", "индивидуум" или "пациент" отно-

сится к людям и ветеринарным субъектам, в частности к животным, предпочтительно к млекопитающим, еще более предпочтительно к человеку, включая взрослого и ребенка. Однако термин "субъект" также охватывает животных, отличных от человека, в частности млекопитающих, таких как собаки, кошки, лошади, коровы, свиньи, овцы и не являющиеся человеком приматы, среди прочих.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату одного или более активных агентов, таких как содержащий антигенсвязывающий домен антитела к LILRB2 или sdAb по изобретению, с необязательными другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Целью фармацевтической или ветеринарной композиции является облегчение введения активного агента в организм. Композиции по данному изобретению могут быть в форме, подходящей для любого обычного способа введения или применения. В одном варианте осуществления под "фармацевтической композицией" обычно понимается комбинация активного агента, например соединения или композиции, и природного или не природного носителя, инертного (например, обнаруживаемый агент или метка) или активного вещества, такого как адъювант, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т.п., и включает фармацевтически приемлемые носители.

"Приемлемый носитель", как упоминается в данном документе, представляет собой любое известное соединение или комбинацию соединений, которые, как известно специалистам в данной области, могут быть полезными при составлении фармацевтических или ветеринарных композиций.

"Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое при введении субъекту представляет собой количество активного агента, необходимое для лечения целевого заболевания или расстройства, или для получения желаемого эффекта. Эффективное количество будет варьироваться в зависимости от агента(-ов), заболевания и его тяжести, а также возраста, массы и характеристик субъекта, подлежащего лечению.

Используемый в данном документе термин "лекарственное средство" относится к любому веществу или композиции с лечебными или профилактическими свойствами против расстройств и/или заболеваний.

Однодоменные антитела, направленные против LILRB2.

Как упоминалось выше, молекулы sdAb соответствуют переменной области только тяжелых цепей антител, которые в природе лишены легких цепей. Антигенсвязывающие поверхности sdAb обычно более выпуклые (или выступающие), чем поверхности обычных антител, которые обычно плоские или вогнутые.

Однодоменное антитело по изобретению содержит один переменный домен, полученный из антитела, способного связывать антиген или эпитоп (например, LILRB2) отдельно, т.е. без необходимости наличия другого связывающего домена. В частности, однодоменное антитело по изобретению лишено легкой цепи или ее фрагмента. Молекулы sdAb по данному изобретению представляют собой полипептиды, содержащие, состоящие из или по существу состоящие из антигенсвязывающего домена антитела, содержащего только тяжелые цепи (HcAb), которые могут быть выделены из Camelidae, хрящевых рыб, наивной библиотеки или из сконструированной формы переменной домена тяжелой цепи антитела. Предпочтительно sdAb получают из HcAb верблюдовых, предпочтительно из HcAb альпаки.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления однодоменное антитело выбрано из группы, состоящей из VHH, V-NAR из Ig-NAR, сконструированных V-NAR, вариантов VHH, в частности гуманизированного VHH или оптимизированного VHH, и их комбинации.

В одном варианте осуществления sdAb к LILRB2 представляет собой оптимизированное sdAb. Оптимизированное sdAb относится к варианту sdAb, полученному из изолированного HcAb, которое содержит одну или более аминокислотных модификаций по сравнению с встречающимся в природе sdAb, причем указанные модификации позволяют, например, повысить стабильность sdAb или повысить аффинность и /или селективность варианта sdAb в отношении LILRB2.

В другом или дополнительном варианте осуществления sdAb к LILRB2 представляет собой гуманизированное sdAb. Гуманизированное sdAb относится к варианту sdAb, который содержит одну или более аминокислотных модификаций по сравнению с встречающимся в природе sdAb, причем указанные модификации позволяют снизить его иммуногенность по отношению к человеку без значительного снижения аффинности к LILRB2. Гуманизированное sdAb по данному изобретению может быть получено путем замены одной или более аминокислот в последовательности sdAb Camelidae или хрящевых рыб их человеческим аналогом, предпочтительно таким, который содержится в консенсусной последовательности человека, при условии, что указанная аминокислотная модификация не оказывает существенного влияния на антигенсвязывающую способность полученного sdAb, а также на его свойства, такие как способность ингибировать взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G). Такой способ хорошо известен специалистам в данной области техники. Уровень техники предоставляет несколько примеров гуманизированного каркаса для VHH, которые можно использовать в контексте изобретения. Гуманизированные sdAb включают частично гуманизированные sdAb и полностью гуманизированные sdAb.

Потенциально полезные гуманизирующие аминокислотные модификации, в частности замены, мо-

гут быть определены путем сравнения последовательности каркасных областей природной последовательности VHH с соответствующей каркасной последовательностью одной или более близкородственных последовательностей VH человека, после чего одна или более из определенных таким образом потенциально полезных гуманизирующих замен (или их комбинаций) могут быть введены в указанную последовательность VHH (любым известным способом) и полученные гуманизированные последовательности VHH могут быть протестированы на аффинность к мишени, стабильность, легкость и уровень экспрессии и/или другие желаемые свойства. Таким образом, путем ограниченного количества проб и ошибок квалифицированный специалист может определить подходящие гуманизирующие замены (или их подходящие комбинации). В качестве альтернативы специалист в данной области может привить CDR VHH в гуманизированный каркас VHH, описанный в уровне техники, чтобы получить желаемое гуманизированное sdAb, направленное против LILRB2. Способ гуманизации sdAb, а также каркасы гуманизированных sdAb представлены, например, в заявке на патент США US 2010/0215664, WO2011/117423 или в таких публикациях, как Conrath et al., *Journal of Molecular Biology*, 2005, 350:112-125 и Vincke, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 3273-3284.

В качестве альтернативы специалист в данной области может привить CDR в универсальный каркас sdAb, описанный в уровне техники (Saerens et al., *J. Mol. Biol.* (2005), 352, 597-607), чтобы получить желаемое sdAb, направленное против LILRB2. sdAb по изобретению может представлять собой VHH, содержащий универсальный структурный каркас, например, как показано Saerens et al. и содержащий по меньшей мере одну CDR, предпочтительно три CDR, как определено ниже.

Однодоменное антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, предпочтительно три области, определяющие комплементарность (CDR), которые определяют его специфичность связывания. Предпочтительно однодоменное антитело содержит несколько, предпочтительно 3 CDR, которые распределены между каркасными областями (FR). CDR и FR предпочтительно представляют собой фрагменты, варианты или производные природного переменного домена антитела. CDR обычно имеют длину от 5 до 30 аминокислот и демонстрируют высокую вариабельность как по содержанию последовательности, так и по структуре, которые участвуют в связывании антигена и обеспечивают антигенную специфичность.

Предпочтительно однодоменное антитело содержит четыре каркасные области или "FR", которые упоминаются в данной области техники и в данном документе как "каркасная область 1" или "FR1"; как "каркасная область 2" или "FR2"; как "каркасная область 3" или "FR3" и как "каркасная область 4" или "FR4" соответственно. Эти каркасные области прерываются тремя областями, определяющими комплементарность 0 или "CDR", которые упоминаются в данной области техники как "область, определяющая комплементарность 1" или "CDR1"; как "область, определяющая комплементарность 2" или "CDR2"; и как "область, определяющая комплементарность 3" или "CDR3" соответственно. Эти каркасные области и области, определяющие комплементарность, предпочтительно функционально связаны в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (от аминоконца к карбоксиконцу).

CDR данного sdAb можно определить любым способом, доступным специалистам в данной области. Например, но не ограничиваясь этим, для определения CDR можно использовать способ Chlothia или способ Kabat (Chlothia et al., *Nature*, 342, 877-883; Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Также можно использовать альтернативный способ определения CDR, такой как промежуточный способ между Chlothia и Kabat, называемый AbM (программное обеспечение для моделирования антител AbM компании Oxford Molecular), или так называемый "контактный" способ, основанный на анализе доступных сложных структур (Saerens et al., *Mol. Biol.* 2005) or on the IMGT method, such as disclosed in Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27:55-77 (схема нумерации "IMGT").

По сравнению с обычным человеческим антителом VH несколько аминокислот могут быть заменены в области FR2 и CDR sdAb. Например, высококонсервативные гидрофобные аминокислоты (такие как Val47, Gly49, Leu50 и/или Trp52) в области FR2 часто заменяются гидрофильными аминокислотами (Phe42, Glu49, Arg50, Gly52), делая общую структуру более гидрофильной, и способствует высокой стабильности, растворимости и устойчивости к агрегации.

В некоторых конкретных вариантах осуществления однодоменное антитело по изобретению содержит CDR3, которая содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 или 33, или содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая отличается от 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 или 33 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций. Предпочтительно однодоменное антитело по изобретению содержит CDR3, которая содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9, или содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая отличается от SEQ ID NO: 3, 6 или 9 по причине одной, двух или трех аминокислотных модификаций. Предпочтительно такие аминокислотные модификации не оказывают значительного влияния на способность связывания полученного sdAb с антигеном, а также на его свойства, такие как способность ингибировать взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G). Предпочтительно такие аминокислотные модификации представляют собой замены, такие как молчащие замены.

модификаций.

Предпочтительно такие аминокислотные модификации не оказывают значительного влияния на способность связывания полученного sdAb с антигеном, а также на его свойства, такие как способность ингибировать взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G). Предпочтительно такие аминокислотные модификации представляют собой замены, такие как молчащие замены.

Еще более предпочтительно, sdAb к LILRB2 содержит три CDR, в которых CDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 1 одной, двумя или тремя аминокислотными модификациями, предпочтительно одной, двумя или тремя молчащими мутациями, еще более предпочтительно одной, двумя или тремя молчащими заменами, и CDR2 содержит или представляет собой SEQ ID NO: 2 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 2 одной, двумя или тремя аминокислотными модификациями, предпочтительно одной, двумя или тремя молчащими мутациями, еще более предпочтительно одной, двумя или тремя молчащими заменами, и CDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 3 или имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 3 одной, двумя или тремя аминокислотными модификациями, предпочтительно одной, двумя или тремя молчащими мутациями, еще более предпочтительно одной, двумя или тремя молчащими заменами.

В некоторых вариантах осуществления sdAb к LILRB2 содержит или по существу состоит из последовательности, определенной в любой из последовательностей от SEQ ID NO: 34 до SEQ ID NO: 44 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности.

Предпочтительно антитело sdAb к LILRB2 содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36, или последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности, предпочтительно на по меньшей мере 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности.

В одном варианте осуществления sdAb к LILRB2 содержит или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO: 34 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с ней, предпочтительно по меньшей мере 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности. Предпочтительно антитело sdAb к LILRB2, которое содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 34, все еще способно связываться с LILRB2, предпочтительно с аффинностью, аналогичной sdAb к LILRB2, которое содержит или состоит из последовательности, определенной в SEQ ID NO: 34, и сохраняет те же свойства, такие как способность ингибировать взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G).

В некоторых конкретных вариантах осуществления sdAb по изобретению имеет молекулярную массу от около 11 до около 18 кДа, например, от 11 до 17 кДа, например, от 14 до 16 кДа, или от 14,5 до 15,5 кДа, например, около 15 кДа.

В некоторых аспектах sdAb связывает LILRB2 с аффинностью по меньшей мере около 10^{-6} или 10^{-7} М, предпочтительно по меньшей мере 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} или 10^{-11} М. В частности, очевидная K_d составляет от 0,1 нМ до 10 мкМ, в частности, от 1 мкМ до 1 нМ. Аффинность связывания может быть измерена любым способом, доступным специалисту в данной области, в частности способом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В предпочтительном варианте осуществления sdAb к LILRB2 не распознает других членов семейства LILBR, отличных от LILRB2. Предпочтительно sdAb к LILRB2 не распознает LILRB1. В качестве альтернативы, sdAb к LILRB2 слабо распознает LILRB1.

Предпочтительно антитело sdAb к LILRB2 распознает LILRB1 меньше, чем LILRB2, особенно в 10, 100 или 1000 раз.

В конкретном варианте осуществления sdAb к LILRB2 конкурентно ингибирует взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G) или конкурентно ингибирует связывание человеческого лейкоцитарного антигена-G (HLA-G) с LILRB2.

Термин "конкурентно ингибирует" указывает, что sdAb по изобретению может снижать, ингибировать или замещать связывание белка, антитела или лиганда с LILRB2 или взаимодействие между любым белком, антителом или лигандом и LILRB2, в частности, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Конкурентные анализы могут быть выполнены с использованием стандартных способов, таких как, например, конкурентный ИФА или другие анализы связывания. Когда sdAb ингибирует или замещает по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70 или 80% связывания белка, антитела или лиганда с LILRB2, оно считается конкурентным. Предпочтительные конкурирующие sdAb связывают эпитопы, которые имеют общие аминокислотные остатки с эпитопами, распознаваемыми или связываемыми белком, антителом или лигандом на LILRB2.

Используемый в данном документе термин "HLA-G" обозначает человеческий лейкоцитарный антиген G, который включает по меньшей мере семь изоформ, четыре из которых являются мембраносвязанными (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4), а три являются растворимыми (HLA-G5, HLA-G6 и

HLA-G7). Изоформы HLA-G человека описаны, например, под номером доступа P17693-1 для HLA-G1, P17693-2 для HLA-G2, P17693-3 для HLA-G3, P17693-4 для HLA-G4, P17693-5 для HLA-G5, P17693-6 для HLA-G6, P17693-7 для HLA-G7.

В конкретном варианте осуществления sdAb к LILRB2 конкурентно ингибирует взаимодействие между LILRB2 и HLA-G6 или конкурентно ингибирует связывание HLA-G6 с LILRB2.

В другом варианте осуществления sdAb по изобретению конкурентно ингибирует связывание ангиопоэтинподобного белка 2 (ANGPTL2) с LILRB2 или конкурентно ингибирует взаимодействие между LILRB2 и ANGPTL2. Используемый в данном документе термин "ANGPTL2" относится к члену семейства факторов роста эндотелия сосудов, которые известны в данной области благодаря своим проангиогенным и антиапоптотическим свойствам. Этот термин предпочтительно относится к ANGPTL2 человека. Например, ANGPTL2 человека описан под номером доступа Uniprot O15123.

Изобретение также относится к химерным агентам (также взаимозаменяемо называемым в данном документе "конъюгатами"), содержащим одно или более sdAb к LILRB2, как определено выше, конъюгированных по меньшей мере с одной молекулой. Молекула, конъюгированная с sdAb, может быть, например, любым активным соединением, используемым в медицине, таким как лекарство, молекула для визуализации, диагностический агент, индикатор, метка или краситель. Химерный агент может также содержать в дополнение к указанному активному соединению или вместо него стабилизирующую группу (например, Fc или IgG, например) для увеличения периода полувыведения sdAb или конъюгата из плазмы. Такой химерный агент может быть получен путем связывания sdAb и молекулы любыми способами, известными в данной области, предпочтительно химическим, биохимическим или ферментативным путем или с помощью генной инженерии.

В конкретном варианте осуществления sdAb к LILRB2 по изобретению может быть слито или конъюгировано со средством для мечения, например, молекулой или белком, выбранными из фермента, такого как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза, флуоресцентного белка, такого как GFP, флуоресцентной метки, такой как флуоресцеин родамин, метки, хемилюминесцентной метки или биоломинесцентной метки, такой как люминал, хромофор, радиоизотоп, например, подходящих для визуализации или диагностики *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

В другом конкретном варианте осуществления sdAb по изобретению включено в конструкцию CAR. Термины "химерный антигенный рецептор" (CAR), "модифицированный клеточный рецептор" или "химерный иммунный рецептор" (ICR), используемые в данном документе, относятся к сконструированным рецепторам, которые прививают антигенсвязывающую специфичность иммунным клеткам, таким образом объединяя антигенсвязывающие свойства антигенсвязывающего домена с иммуногенной активностью иммунной клетки, такой как литическая способность и самообновление Т-клеток. В частности, CAR относится к слитому белку, содержащему необязательно сигнальный пептид, внеклеточный домен, способный связывать антиген, трансмембранный домен, необязательно шарнирный домен и по меньшей мере один внутриклеточный домен. В предпочтительном варианте осуществления CAR содержит sdAb к LILRB2, как описано в данном документе, в виде внеклеточного или антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена, необязательно шарнирного домена и по меньшей мере одного внутриклеточного домена.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

Еще один аспект изобретения относится к конструкции выделенной нуклеиновой кислоты или конструкции полипептида, кодирующей sdAb, как определено выше. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной или их смесью. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (кДНК или гДНК), РНК или их смесь. Она может содержать модифицированные нуклеотиды, содержащие, например, модифицированную связь, модифицированное пуриновое или пиримидиновое основание или модифицированный сахар. Ее можно получить любым способом, известным специалисту в данной области, включая химический синтез, рекомбинацию и/или мутагенез.

Нуклеиновая кислота по изобретению может быть выведена из аминокислотной последовательности молекул sdAb по изобретению, а использование кодонов может быть адаптировано в соответствии с клеткой-хозяином, в которой должна быть транскрибирована нуклеиновая кислота. Эти этапы могут быть выполнены в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области, некоторые из которых описаны в справочном руководстве Sambrook et al. (Sambrook J., Russell D. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third Edition Cold Spring Harbor). Конкретные примеры таких последовательностей нуклеиновых кислот включают последовательности, содержащие любую из SEQ ID NO: 61-75, и комплементарную ей последовательность.

Изобретение также относится к вектору, содержащему такую выделенную нуклеиновую кислоту, необязательно под контролем регуляторных последовательностей (например, промотора, терминатора и т.д.). Вектор может быть, например, плазмидой, вирусом, космидой, фагмидой или искусственной хромосомой.

Данное изобретение дополнительно относится к применению нуклеиновой кислоты или вектора по изобретению для трансформации, трансфекции или трансдукции клетки-хозяина.

Таким образом, данное изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей одну или более

нуклеиновых кислот по изобретению, и/или один или более векторов по изобретению, и/или один или более полипептидов, кодирующих sdAb по изобретению.

Клеткой-хозяином может быть любая клетка-хозяин, способная экспрессировать или продуцировать sdAb по изобретению, включая, например, прокариотическую клетку-хозяина, такую как, например, *E. coli*, или (культивируемая) клетка-хозяин млекопитающего, растения, насекомого, гриба или дрожжей, включая, например, CHO-клетки, ВНК-клетки, линии клеток человека (включая HeLa, COS и PER C6), клетки Sf9 и клетки Sf+. Подходящая клетка-хозяин включает клетку эукариотического микроорганизма, такого как дрожжи и мицелиальные грибы. Предпочтительная дрожжевая клетка-хозяин включает *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* и *Kluyveromyces lactis*. Термин "клетка-хозяин" также охватывает любое потомство родительской клетки-хозяина, которое не идентично родительской клетке-хозяину из-за мутаций, происходящих во время репликации. Предпочтительно клетка не является эмбриональной стволовой клеткой человека.

Еще одним объектом изобретения является способ получения sdAb по изобретению, включающий следующие стадии:

- a) культивирование клетки-хозяина, как определено ранее, и
- b) выделение указанной нуклеиновой кислоты, вектора или полипептида, кодирующего sdAb, как определено выше, из клеточной культуры.

Само собой разумеется, что стадию a) проводят в условиях, обеспечивающих экспрессию желаемой нуклеиновой кислоты, вектора или полипептида клеткой-хозяином. Подходящие условия экспрессии могут включать использование подходящей среды, наличие подходящего источника питания и/или подходящих питательных веществ, подходящую температуру и, необязательно, присутствие подходящего индуцирующего фактора или соединения (например, когда нуклеотидные последовательности по изобретению находятся под контролем индуцибельного промотора); все они могут быть выбраны специалистом в данной области техники.

В таких условиях sdAb по изобретению может экспрессироваться конститутивно, транзитивно или только при подходящей индукции.

Затем sdAb по изобретению можно выделить из клетки-хозяина и/или из культуральной среды, в которой культивировали указанную клетку-хозяин, с использованием известных способов выделения и/или очистки белка, таких как техники хроматографии и/или электрофореза, дифференциальная техника осаждения, техники на основе аффинности т.п. Для целей очистки sdAb может также содержать метку, такую как гистидиновая или стрептавидиновая метка.

Изобретение также относится к способу получения sdAb к LILRB2, как определено в данном документе. Способ получения и/или отбора sdAb по изобретению может быть основан на методике селекции белков, такой как, но не ограничиваясь этим, клеточный дисплей, фаговый дисплей, рибосомный дисплей, дисплей мРНК, дисплей ДНК или дисплей плазмиды. Эти методики хорошо описаны в уровне техники. Например, для создания библиотеки V_HN, представленных на бактериофагах, специалист в данной области техники может обратиться к Muydermans et al., *Molecular Biotechnology*, 2001, 74, 277-302, в частности к разделу, озаглавленному Recombinant V_HN, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Для создания библиотеки V-NAR, представленных на бактериофагах, специалист в данной области техники может обратиться к Dooley et al., *Mol. Immunol.*, 2003, 40:25-30. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать одну или более стадий, позволяющих выбрать функциональные sdAb, в частности sdAb, которые способны распознавать LILRB2 или которые конкурентно ингибируют взаимодействие между LILRB2 и HLA-G и/или которые конкурентно ингибируют взаимодействие между LILRB2 и ANGPTL2.

В конкретном варианте осуществления CAR, содержащий sdAb по изобретению, экспрессируется клеткой. Клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой. Предпочтительно клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. Предпочтительно клетки, экспрессирующие CAR, содержащие sdAb по изобретению, представляют собой иммунные клетки. Клетки могут быть выбраны из группы, состоящей из макрофагов, Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, НКТ, моноцитов и дендритных клеток. Предпочтительно клетка не является эмбриональной стволовой клеткой человека.

Фармацевтическая композиция.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, отличающейся тем, что она содержит по меньшей мере одно sdAb, CAR или клетку, как определено выше, и необязательно одно или более фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть составлена в соответствии со стандартными способами, такими как описанные в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins; Twenty first Edition, 2005). Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые могут быть использованы, описаны, в частности, в Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press; 6th revised edition, 2009).

В одном аспекте композиции по изобретению предпочтительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемый носитель может быть

выбран из носителей, классически используемых в соответствии с каждым способом введения, таких как (a) наполнители или разбавители, такие как, например, крахмал, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит, микрокристаллическая целлюлоза и кремниевая кислота; (b) связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, желатин, поливинилпирролидон, сахароза; (c) смачиватели, такие как, например, глицерин; (d) разрыхлители, такие как, например, агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые комплексные силикаты, кроскармеллоза натрия и карбонат натрия; (e) замедлители растворения, такие как, например, парафин; (f) ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; (g) смачивающие агенты, такие как моностеарат глицерина; (h) адсорбенты, такие как каолин и бентонит; (i) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, (j) антиоксиданты, (k) буферные вещества, такие как цитрат натрия или фосфат натрия, (l) консерванты, (m) ароматизаторы и отдушки и др.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть получена путем смешивания sdAb, CAR, клетки или полипептида по изобретению с соответствующей степенью чистоты по меньшей мере с одним обычным вспомогательным веществом (или носителем), как описано выше. В частности, активным ингредиентом композиции является sdAb, CAR, клетка или полипептид по изобретению.

Само собой разумеется, что вспомогательное(ые) вещество(а), которые должны быть объединены с активным ингредиентом, могут варьироваться в зависимости от (i) физико-химических свойств, включая стабильность указанного активного ингредиента, (ii) желаемого фармакокинетического профиля для указанного активного ингредиента, (iii) галеновой формы и (iv) способа введения.

Фармацевтические композиции обычно содержат эффективную дозу sdAb, CAR или клетки по изобретению. "Терапевтически эффективная доза", как описано в данном документе, относится к дозе, которая дает терапевтический эффект при данном состоянии и схеме введения. "Терапевтически эффективная доза" активного вещества не обязательно излечивает заболевание или расстройство, но обеспечивает лечение этого заболевания или расстройства таким образом, чтобы его появление было отсрочено, затруднено или предотвращено, или его симптомы были ослаблены, или его течение было изменено или было менее тяжелым, или ускорено выздоровление пациента.

Фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для введения любым обычным путем, включая энтеральный путь (т.е. пероральный), т.е. в виде таблеток, капсул, парентерально, внутримышечно, чрескожно, внутривенно, т.е. в виде растворов или суспензий для инъекций, а также для местного применения, т.е. в виде гелей, мазей, гелей, лосьонов, пластырей, суппозитория и т.п.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой лиофилизат или лиофилизированный порошок, который можно растворять в подходящем носителе непосредственно перед введением субъекту.

Изобретение также относится к диагностической композиции, отличающейся тем, что она содержит соединение sdAb или конъюгат sdAb с диагностическим или медицинским визуализирующим агентом, таким как определено выше.

Использование по изобретению sdAb, CAR, клетки, композиции и конструкции (т.е. выделенные нуклеиновые кислоты, полипептиды и/или векторы) по изобретению можно использовать в различных областях, включая биологические исследования, биохимическую промышленность или медицину.

В частности, sdAb, CAR, клетки, композиции и конструкции по данному изобретению находят применение у субъектов, имеющих или подозреваемых в наличии рака, в частности, для уменьшения размера опухоли или предотвращения роста или повторного роста опухоли у этих субъектов или предотвращения индукции иммуносупрессивной микросреды.

В одном варианте осуществления субъектом лечения является животное, отличное от человека, в частности млекопитающие, такое как собаки, кошки, лошади, коровы, свиньи, овцы и не являющиеся человеком приматы. В качестве альтернативы, субъектом лечения может быть человек, в частности человек, в любом возрасте, включая ребенка, подростка или взрослого.

В частности, субъект страдает заболеванием, которое включает экспрессию LILBR2, в частности сверхэкспрессию LILBR2. В одном варианте осуществления субъект страдает раком, воспалительным заболеванием, инфекционным заболеванием, например, таким, которое вызывается бактерией, вирусом или грибом, или аутоиммунным заболеванием.

Предпочтительно субъект страдает от рака, еще более предпочтительно от рака, положительного по отношению к LILBR2. Например, субъект, подходящий для лечения такого заболевания, как рак, может быть идентифицирован путем изучения того, является ли такой субъект носителем LILRB2-положительных клеток, в частности, LILRB2-положительных раковых клеток, предпочтительно таких клеток, которые сверхэкспрессируют LILRB2. Примеры заболеваний и рака более подробно описаны ниже.

Еще одной целью изобретения является sdAb, CAR, клетка, полипептидная конструкция или фармацевтическая композиция по изобретению для применения при лечении расстройства или заболевания, включающего рецептор LILRB2, предпочтительно такого, как рак, и/или для использования в качестве

лекарства или вакцины. Соответственно, в данном документе описаны способы ингибирования роста опухоли или распространения метастазов у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. Опухоль может быть солидной опухолью или жидкой опухолью, предпочтительно солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак экспрессирует или сверхэкспрессирует LILRB2.

В некоторых вариантах осуществления эти способы включают или, в качестве альтернативы, по существу состоят из введения субъекту или пациенту терапевтически эффективного количества sdAb, CAR, клеток, композиций и конструкций по данному изобретению. В еще одном аспекте субъект предварительно был выбран для терапии с помощью диагностики, предпочтительно для оценки того, экспрессирует или сверхэкспрессирует ли опухоль LILRB2.

Поскольку человеческий LILRB2 является подходящей мишенью для лечения заболевания или расстройства, в частности, такого как рак, sdAb к LILRB2 можно использовать в качестве лекарственного средства, медикамента или вакцины. sdAb, CAR, клетка или полипептидная конструкция по изобретению могут быть использованы в качестве лекарственного средства или вакцины или для изготовления лекарственного средства или вакцины при лечении заболевания, расстройства или состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления такое лекарственное средство или вакцину можно использовать для лечения рака.

В одном варианте осуществления sdAb, CAR, клетки, композиции и конструкции по данному изобретению предназначены для применения при лечении патологии, заболевания и/или расстройства, которое можно предотвратить или лечить путем ингибирования связывания HLAG и/или ANGPTL2 с LILRB2. Соответственно, изобретение относится к способу лечения патологии, заболевания и/или расстройства, которое можно предотвратить или вылечить путем ингибирования связывания HLAG и/или ANGPTL2 с LILRB2.

Изобретение также относится к способу лечения субъекта, страдающего расстройством или заболеванием, связанным с рецептором LILRB2, где указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества sdAb, CAR, клетки, конструкции или фармацевтической композиции по изобретению.

В конкретном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой рак, предпочтительно солидные опухоли, еще более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака поджелудочной железы, протоковой карциномы поджелудочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рака яичников, рака молочной железы, колоректального рака, глиомы, рака желудка, рака почки, рака яичка, рака пищевода, рака шейки матки, рака легкого Льюиса у мышей, лейкемии, рака щитовидной железы, рака печени, уротелиального рака и рака головы и шеи.

Соответственно, данное изобретение также относится к способам ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, и/или ингибирования роста и/или распространения метастазов. Опухоль может быть солидной опухолью или жидкой опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак экспрессирует или сверхэкспрессирует LILRB2.

Описанные в данном документе sdAb, CAR, клетки или фармацевтические композиции можно вводить одновременно с другими терапевтическими средствами или после, включая, например, малые молекулы, лучевую терапию, химиотерапию, хирургию, особенно противораковые средства. "Противораковое" средство способно негативно воздействовать на рак у субъекта, например, убивая раковые клетки, индуцируя апоптоз в раковых клетках, снижая скорость роста раковых клеток, уменьшая частоту или количество метастазов, уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли, уменьшая кровоснабжение опухоли или раковых клеток, стимулируя иммунный ответ против раковых клеток или опухоли, предотвращая или ингибируя прогрессирование рака или увеличение продолжительности жизни субъекта с раком. В более общем плане эти другие композиции могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации клеток.

Обычные способы, известные специалистам в области медицины, могут быть использованы для введения субъекту sdAb, композиции, конструкции или CAR, описанных в данном документе, в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению, или локализации заболевания. Данную композицию можно вводить обычными путями, например, парентерально (например, внутривенно, подкожно, внутривенно или внутримышечно) или перорально, назально или легочно.

Использование в диагностических и прогностических целях.

Однодоменные антитела можно использовать в качестве лигандов для очистки LILRB2. Их также можно использовать в качестве шаперонов для кристаллизации, чтобы способствовать кристаллизации рецептора LILRB2.

sdAb и полипептиды по изобретению также можно использовать для иммуоокрашивания клеток, визуализации *in vivo* или *in vitro* и для диагностических целей. Изобретение также относится к sdAb, конъюгату или композициям, как описано выше, для применения в диагностике, визуализации или лечении клеток, экспрессирующих LILRB2, предпочтительно сверхэкспрессирующих LILRB2, таких как ра-

ковые клетки.

Их также можно использовать в качестве биологических реагентов в анализах *in vitro*, т.е. в качестве тестируемых соединений или конкурирующих связывающих веществ для идентификации, скрининга или характеристики потенциальных лекарств, нацеленных на рецептор LILRB2.

Описанные в данном документе sdAb к LILRB2 можно использовать в диагностических целях для мониторинга уровней экспрессии LILRB2 в ткани или клетках в рамках процедуры клинического тестирования *in vitro* или *ex vivo*, а также *in vivo*, например, для определения эффективности данной схемы лечения.

Способ обнаружения по данному изобретению можно использовать для определения уровней экспрессии LILRB2 в биологическом образце *in vitro* или *ex vivo*, а также *in vivo*, например, после биопсии органа или ткани, чтобы проверить, являются ли клетки злокачественными. Способы обнаружения LILRB2 *In vitro* или *ex vivo* с помощью sdAb по изобретению включают твердофазные иммуноферментные анализы (ТИФА), РИА, ИФА и другие "сэндвич-анализы", вестерн-блоты, проточную цитометрию, иммунопреципитацию, радиоиммуноанализ и иммунофлуоресценцию (например, ИГХ). Кроме того, методы обнаружения полипептида LILRB2 *in vivo* включают введение субъекту меченого антитела sdAb к LILRB2. В способах обнаружения LILRB2 *in vivo* с помощью sdAb по изобретению sdAb можно метить радиоактивным маркером, присутствие и расположение которого у субъекта можно определить стандартными способами визуализации.

В данном изобретении также предложены диагностические, прогностические или прогнозирующие анализы для определения того, подвержен ли субъект риску развития медицинского заболевания или состояния, связанного с повышенной экспрессией или активностью LILRB2 (например, обнаружение предраковых или раковых клеток, которые сверхэкспрессируют LILRB2). Такие анализы можно использовать в прогностических или предиктивных целях для профилактического лечения индивидуума до начала соматических заболеваний или состояний, характеризующихся или связанных с экспрессией или сверхэкспрессией LILRB2.

В изобретении также предложены диагностические прогностические или прогнозирующие способы анализов, в которых sdAb по изобретению используют для выбора субъектов, подходящих для терапии с помощью sdAb к LILRB2, например, где LILRB2 является биомаркером для отбора пациентов с сверхэкспрессией LILRB2 в клетках, таких как опухолевые клетки.

Наборы.

Любое из sdAb, композиции, CAR, клетки, вектора, полипептида или конструкции нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе, может быть включено в набор, предусмотренный данным изобретением.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит подходящие контейнерные средства, клетки, буферы, клеточные среды, векторы, праймеры, рестрикционные ферменты, соли и т.д., например. Наборы могут также содержать средства для содержания стерильного фармацевтически приемлемого буфера и/или других разбавителей.

В некоторых вариантах осуществления в наборе могут быть предусмотрены средства взятия образца у индивидуума и/или анализа образца.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит дополнительный агент для лечения рака или инфекционного заболевания, и дополнительный агент может быть объединен с sdAb, композицией, CAR, клеткой, вектором, конструкцией полипептида или нуклеиновой кислоты или другими компонентами набора по данному изобретению или могут быть предоставлены в наборе отдельно.

В некоторых случаях изобретения набор также содержит средства второй терапии рака, такой как, например, химиотерапия и/или другая иммунотерапия. Набор(ы) может быть адаптирован к конкретному раку, такому как рак, экспрессирующий или сверхэкспрессирующий LILRB2.

Контейнеры могут быть стандартными дозами, упаковками со множеством доз (например, многодозовыми упаковками) или частичными дозами. В одном варианте осуществления изобретение относится к набору, как определено выше, для введения однократной дозы. Набор по изобретению может также содержать первого реципиента, включающего высушенную/лиофилизированную бифункциональную молекулу, и второго реципиента, включающего водную композицию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предоставляются наборы, содержащие предварительно заполненные однокамерные и многокамерные шприцы (например, жидкостные шприцы и лиошприцы). Наборы по данному изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, без ограничения, флаконы, бутылки, банки, мягкие упаковки (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п.

Инструкции, относящиеся к применению sdAb, композиции, CAR, клетки, вектора, полипептида или конструкции нуклеиновой кислоты, описанные в данном документе, обычно включают информацию о дозировке, графике дозирования, способе введения для предполагаемого лечения или способах восстановления или разбавления таких компонентов. Инструкции, прилагаемые к наборам по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, бумажный лист, включенный в набор в виде листка-вкладыша или руководства по эксплуатации). В не-

которых вариантах осуществления набор может содержать инструкции по применению соответствии с любым из описанных в данном документе способов. Включенные инструкции могут включать описание введения sdAb, композиции, CAR, клетки, вектора, полипептида или конструкции нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе, в частности, в контексте лечения описанного в данном документе заболевания, такого как рак. Набор могут дополнительно содержать описание выбора индивида, подходящего для а лечения, на основании определения того, имеет ли этот индивид заболевание, связанное с LILRB2, например, описанное в данном документе.

Другие аспекты и преимущества данного изобретения станут очевидными при рассмотрении приведенных ниже примеров, которые носят только иллюстративный характер и не ограничивают объем настоящего изобретения.

Примеры

Идентификация LILRB2-Fc-специфических VHH.

Сначала альпаку иммунизировали белками LILRB2-Fc в полном адьюванте Фрейнда, а затем дважды ревакцинировали белками LILRB2-Fc в неполном адьюванте Фрейнда. Из сыворотки альпаки фракционировали обычные подклассы антител (т.е. IgG1) и VHH. Сыворотку серийно разбавляли и тестировали против белков LILRB2-Fc с помощью ИФА. Затем очищали В-лимфоциты альпаки и получили библиотеку, содержащую $3,5 \cdot 10^7$ клонов. Выполняли биоспаннинг с использованием дисплея против LILRB2-Fc и проводили преплазматический (PE)-ELISA на выбранных VHH. Было протестировано 400 колоний, и было идентифицировано 130 положительных клонов против LILRB2, которые обведены сплошной линией, а отрицательные клоны обведены пунктирной линией (фиг. 1). Все положительные клоны секвенировали, создавали и очищали 12 уникальных последовательностей VHH.

Nb B8, C7 и C9 распознают линейные эпитопы rhLILRB2.

Авторы изобретения сначала исследовали, являются ли генерированные Nb специфичными в отношении рецептора LILRB2 без какой-либо перекрестной реактивности в отношении рецептора LILRB1. Для этого вестерн-блоттинг проводили в восстанавливающих условиях. Очищенные димерные белки rhLILRB2-Fc, мономерные белки rhLILRB2 и мономерные белки rhLILRB1 использовали для сравнения антигенной специфичности различных Nb. Специфичность Nb оценивали по сравнению с контрольными антителами H-300 (специфичными в отношении LILRB1, -2, -4, -5, -6), 42D1 (специфичными в отношении LILRB2), GHI/75 (специфичными в отношении LILRB1) и HP-F1 (специфичными в отношении LILRB1). Мембрана, меченная поликлональным антителом H-300 (специфическим для белков LILRB1, -2, -4, -5 и -6), показала полосу около 105 кДа и при 77 кДа, соответствующую размеру rhLILRB2-Fc и rhLILRB2 соответственно (фиг. 2). Мембрана, инкубированная с моноклональным антителом 42D1 (специфическим для рецептора LILRB2-Fc), показала уникальную полосу при 105 кДа, соответствующую размеру rhLILRB2-Fc, и отсутствие полосы при 77 кДа, демонстрируя, что mAb 42D1 не распознает rhLILRB2. Мембрана, инкубированная с моноклональными антителами GHI/75 и HP-F1, показала полосу при 84 кДа, соответствующую размеру rhLILRB1. Среди 15 Nb только B8, C7 и C9 демонстрировали полосу около 105 кДа, соответствующую молекулярной массе доменов D1 и D2 rhLILRB2 (фиг. 3), а также полосу около 77 кДа, соответствующую молекулярной массе доменов D1 и D2 rhLILRB2. Кроме того, инкубация с Nb B8 и C7 не выявила какой-либо полосы около 84 кДа. Это означает, что Nb B8 и C7 не связываются с rhLILRB1. Тем не менее C9 Nb показал слабую полосу около 84 кДа, что свидетельствует о том, что специфичность C9 не полностью ограничена рецептором rhLILRB2. В совокупности эти данные показали, что Nb способны распознавать денатурированный димерный белок LILRB2-Fc (D1-D2-Fc), который был иммуногеном, используемым для индукции Nb, а также денатурированный мономерный белок LILRB2 (домены D1-D2-D3-D4). Для эксперимента вестерн-блоттинга использовали чистое антитело с-Мус "9E10" (E-Bioscience, Ref. 14-6784-82).

Специфичность Nb в отношении рецепторов LILRB2 на клеточной линии D1.1, трансдуцированной LILRB2.

Затем авторы изобретения попытались определить, способны ли полученные Nb связываться с конформационными рецепторами LILRB2. Они оценили специфичность связывания 15 Nb в отношении конформационных рецепторов LILRB2. Для этого авторы изобретения оценивали специфичность Nb на трансдуцированной клеточной линии LILRB2-D1.1, полученной с помощью Investys. Для этой цели клеточную линию LILRB2-D1.1 инкубировали с Nb и сравнивали с контрольным Ab 42D1. Как показано на фиг. 4, 62,6% клеток LILRB2-D1.1 были помечены контрольным антителом 42D1. Интересно, что 93,2%, 76,4 и 75,2% клеточной линии LILRB2-D1.1 были помечены Nb B8, C9 и C7 соответственно (фиг. 7), тогда как менее 40% клеточной линии LILRB2-D1.1 были помечены другими Nb, такими как A2 (данные не показаны). Авторы изобретения предположили, что эпитоп, распознаваемый B8, C7 и C9, более доступен, чем эпитопы контрольного антитела 42D1 и других Nb. Для проточной цитометрии использовали мышиное моноклональное антитело [9E10] с меткой Мус - фикоэритрин (Abcam, Ref: ab72468).

Специфичность Nb в отношении рецепторов LILRB2, экспрессируемых моноцитами.

Моноциты сильно экспрессируют мономерные или димерные рецепторы LILRB2 на своей поверхности и являются подходящей моделью для изучения экспрессии LILRB2 макрофагами. Таким образом, авторы изобретения оценили специфичность Nb к LILRB2 в отношении моноцитов, очищенных от

РВМС здоровых доноров. Моноциты фенотипировали путем мечения антителами против CD14, антителами к LILRB1 и Nb к LILRB2. 38% моноцитов были положительными в отношении контрольного Ab 42D1 и 5% были положительными в отношении нерелевантного Nb (например, Nb, выработанный у альпаки против антигена, отличного от ILT4). Антителом Nb к LILRB2 было помечено более 50% моноцитов: 68,3% A2 Nb, 50,8% B8 Nb, 62% C7 Nb, 58,1% C9 Nb, 53,5% D8 Nb, 57% G3 Nb и 46,7 % G10 Nb (фиг. 5). Тем не менее моноциты были отрицательными для Nb D12, F5 и H12 (данные не показаны). В целом, авторы изобретения определили, что Nb B8, C7 и C9 обладают высокой специфичностью в отношении линейного эпитопа в рецепторах LILRB2, как мономерных, так и димерных. Доступность эпитопа LILRB2 для клеточной линии LILRB2-D1.1, созданной *in vitro*, или для моноцитов *ex vivo* может быть более сложной для контрольного Ab 42D1, чем для Nb. Это слабое связывание моноклонального Ab 42D1, вероятно, связано со стерическими затруднениями, которые не влияют на Nb к LILRB2, особенно Nb B8, C7 и C9.

Nb к LILRB2 ингибирует взаимодействие LILRB2/HLA-G.

Рецепторы LILRB2 взаимодействуют либо с HLA-G, либо с ANGPTL2, ингибируя ответы иммунных клеток и индуцируя развитие опухоли соответственно. Затем авторы изобретения исследовали, способны ли антитела к LILRB2 блокировать эти взаимодействия, чтобы восстановить функции иммунных клеток и предотвратить рост опухоли. Для изучения ингибирования взаимодействия LILRB2/HLA-G авторы изобретения сначала разработали ИФА для оценки блокирующей способности Nb. Для этой цели белки rhLILRB2-Fc покрывали планшет для микротитрования перед совместной инкубацией с белком HLA-G6 в присутствии или в отсутствие Nb. Было продемонстрировано, что рецепторы rh-LILRB2-Fc обладают сильным сродством к растворимой изоформе HLA-G6. Как показано на фигуре 6, изотипическое контрольное моноклональное антитело препятствует взаимодействию HLA-G6/LILRB2 (24% блокирования), а также поликлональное антитело H-300, о блокировании которого не сообщалось (26% блокирования). Однако моноклональное блокирующее антитело к LILRB2 27D6 сильно устраняло взаимодействие между рецепторами HLA-G6 и LILRB2 (100% блокирования). Что касается Nb к LILRB2, авторы изобретения определили, что 7 Nb (A2, C7, C9, D8, E7, F5 и G10) слабо ингибируют взаимодействие (<30%), 3 Nb показали частичное ингибирование: D12 (44,8%), G3 (39,4%) и H12 (50%), тогда как Nb B8 полностью ингибирует взаимодействие HLA-G6/LILRB2 (100% блокирования).

Nb B8 частично ингибирует взаимодействие LILRB2/ANGPTL2.

Показано, что взаимодействие LILRB2/ANGPTL2 способствует развитию опухоли.

Действительно, взаимодействие между рецепторами LILRB2, экспрессируемыми раковыми клетками, и белком ANGPTL2, аутокринная экспрессия, приводит к опухолевой пролиферации, ингибированию опухолевого апоптоза и дифференцировке опухолевых клеток. Чтобы определить, способны ли Nb к LILRB2 блокировать это взаимодействие, авторы изобретения провели ИФА для оценки взаимодействия между белками rhLILRB2-Fc и ANGPTL2. Как описано ранее, белками rhLILRB2-Fc покрывали планшет для микротитрования перед совместной инкубацией с rhANGPTL2 в присутствии или в отсутствие антител к LILRB2 или Nb. Некоторые Nb частично блокировали взаимодействие LILRB2/ANGPTL2 (ингибирование связывания <24%) (данные не показаны). Nb B8 сильно блокировал это взаимодействие (ингибирование связывания на 51,4%) по сравнению с контролем без Nb, в то время как A2, H12 и G10 демонстрировали слабое блокирование (24%, 20% и 8% соответственно) (фиг. 7).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменное антитело (sdAb), которое специфически связывается с членом 2 подсемейства В лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRB2), где указанное sdAb содержит три определяющие комплементарности области (CDR), где CDR1 содержит SEQ ID NO: 1, CDR2 содержит SEQ ID NO: 2 и CDR3 содержит SEQ ID NO: 3.

2. sdAb по п. 1, где LILRB2 представляет собой LILRB2 человека.

3. sdAb по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанное sdAb не связывается с членом 1 подсемейства В лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRB1).

4. sdAb по п.3, где LILRB1 представляет собой LILRB1 человека.

5. sdAb по любому из пп.1-4, где указанное sdAb содержит последовательность, определенную в SEQ ID NO: 34.

6. sdAb по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанное sdAb ингибирует взаимодействие между LILRB2 и человеческим лейкоцитарным антигеном-G (HLA-G).

7. sdAb по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанное sdAb ингибирует взаимодействие между LILRB2 и ангиопоэтиноподобным белком 2 (ANGPTL2).

8. sdAb по любому из пп.1-7, где указанное sdAb конъюгировано по меньшей мере с одной молекулой.

9. sdAb по любому из пп.1-7, где указанное sdAb конъюгировано со стабилизирующей группой.

10. sdAb по п.9, где стабилизирующая группа представляет собой Fc или IgG.

11. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую sdAb по лю-

бому из пп.1-10.

12. Выделенная нуклеиновая кислота по п.11, где выделенная нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 45.

13. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.11 или 12.

14. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий sdAb по любому из пп.1-9 или sdAb, закодированное выделенной нуклеиновой кислотой по п.11 или 12.

15. Клетка, экспрессирующая sdAb по любому из пп.1-10.

16. Клетка, экспрессирующая CAR по п.14.

17. Клетка, экспрессирующая CAR по п.16, отличающаяся тем, что клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, моноцита и дендритной клетки.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая sdAb по любому из пп.1-10, выделенную нуклеиновую кислоту по п.11 или 12, вектор по п.13, CAR по п.14, клетку, экспрессирующую sdAb по п.15, или клетку, экспрессирующую CAR по п.16 или 17.

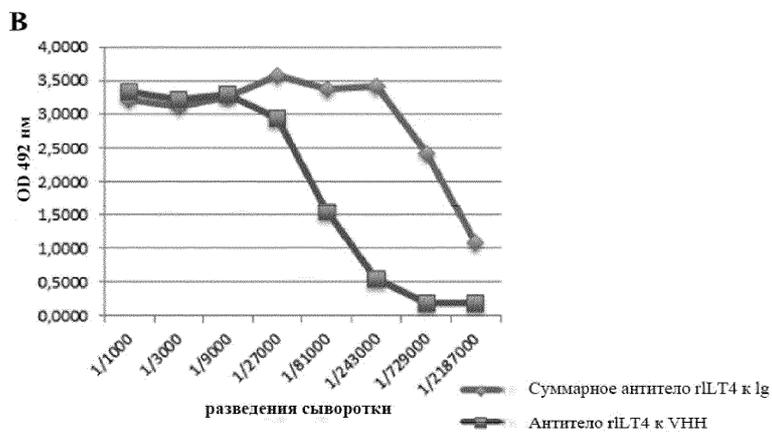
19. Фармацевтическая композиция по п.18, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

20. Применение sdAb по любому из пп.1-10, выделенной нуклеиновой кислоты по п.11 или 12, вектора по п.13, CAR по п.14, клетки, экспрессирующей sdAb по п.15, или клетки, экспрессирующей CAR по п.16 или 17, или фармацевтической композиции по п.18 или 19 в качестве медикамента.

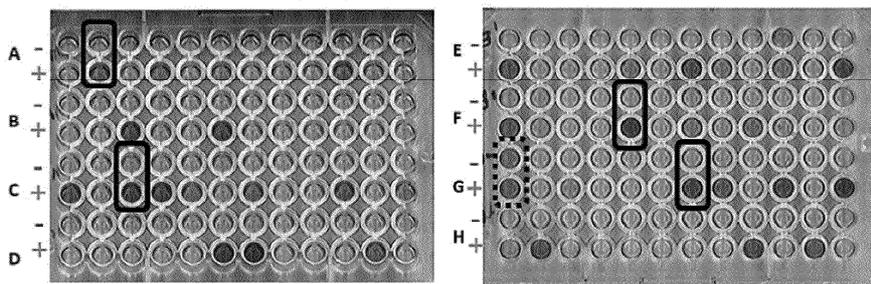
21. Применение sdAb по любому из пп.1-10, выделенной нуклеиновой кислоты по п.11 или 12, вектора по п.13, CAR по п.14, клетки, экспрессирующей sdAb по п.15, клетки, экспрессирующей CAR по п.16 или 17, или фармацевтической композиции по п.18 или 19 при лечении рака, положительного по LILBR2.

22. Применение по п.21, где положительный по LILBR2 рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака поджелудочной железы, протоковой карциномы поджелудочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рака яичников, рака молочной железы, колоректального рака, глиомы, рака желудка, рака почки, рака яичка, рака пищевода, рака шейки матки, рака легкого Льюиса у мышей, лейкемии, рака щитовидной железы, рака печени, уротелиального рака и рака головы и шеи.

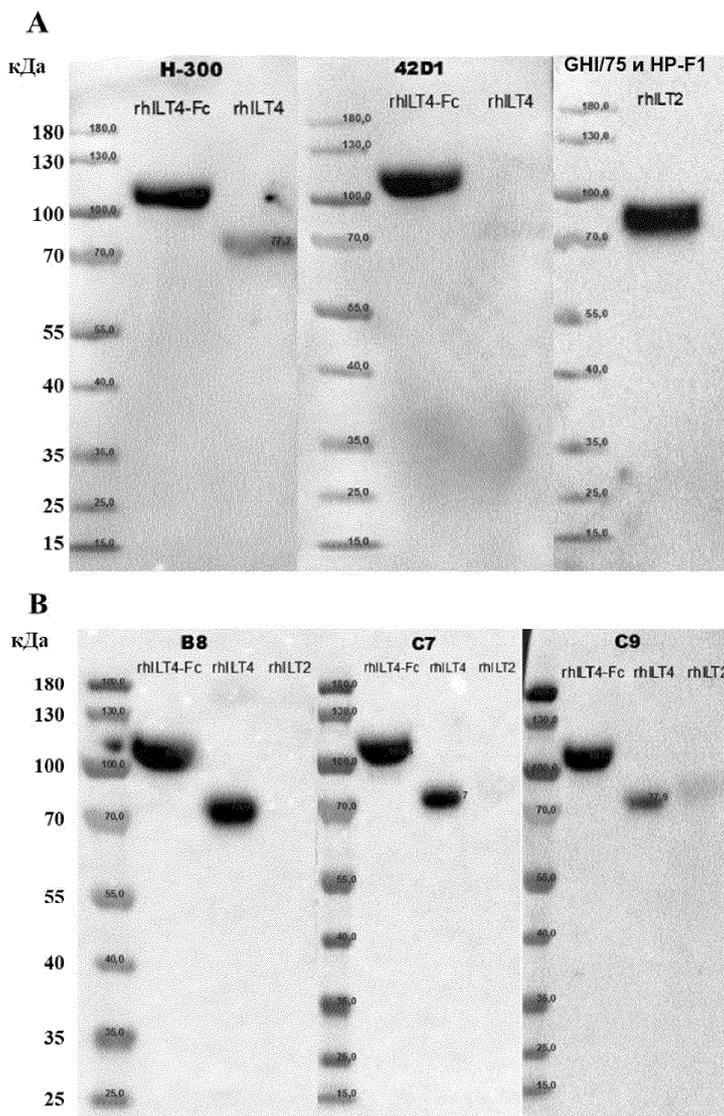
23. Применение sdAb по любому из пп.1-10 для обнаружения LILRB2 на опухолевых клетках или тканях *in vitro* или *ex vivo*.



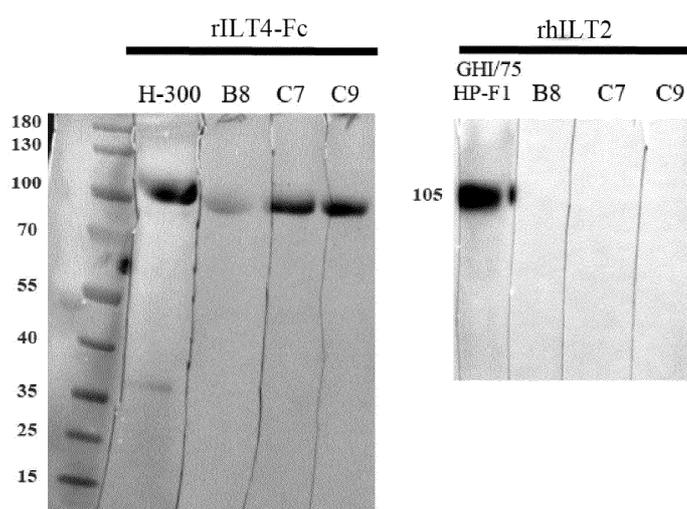
С (-) IgG1 (+) ИЛТ4 1 мкг/мл



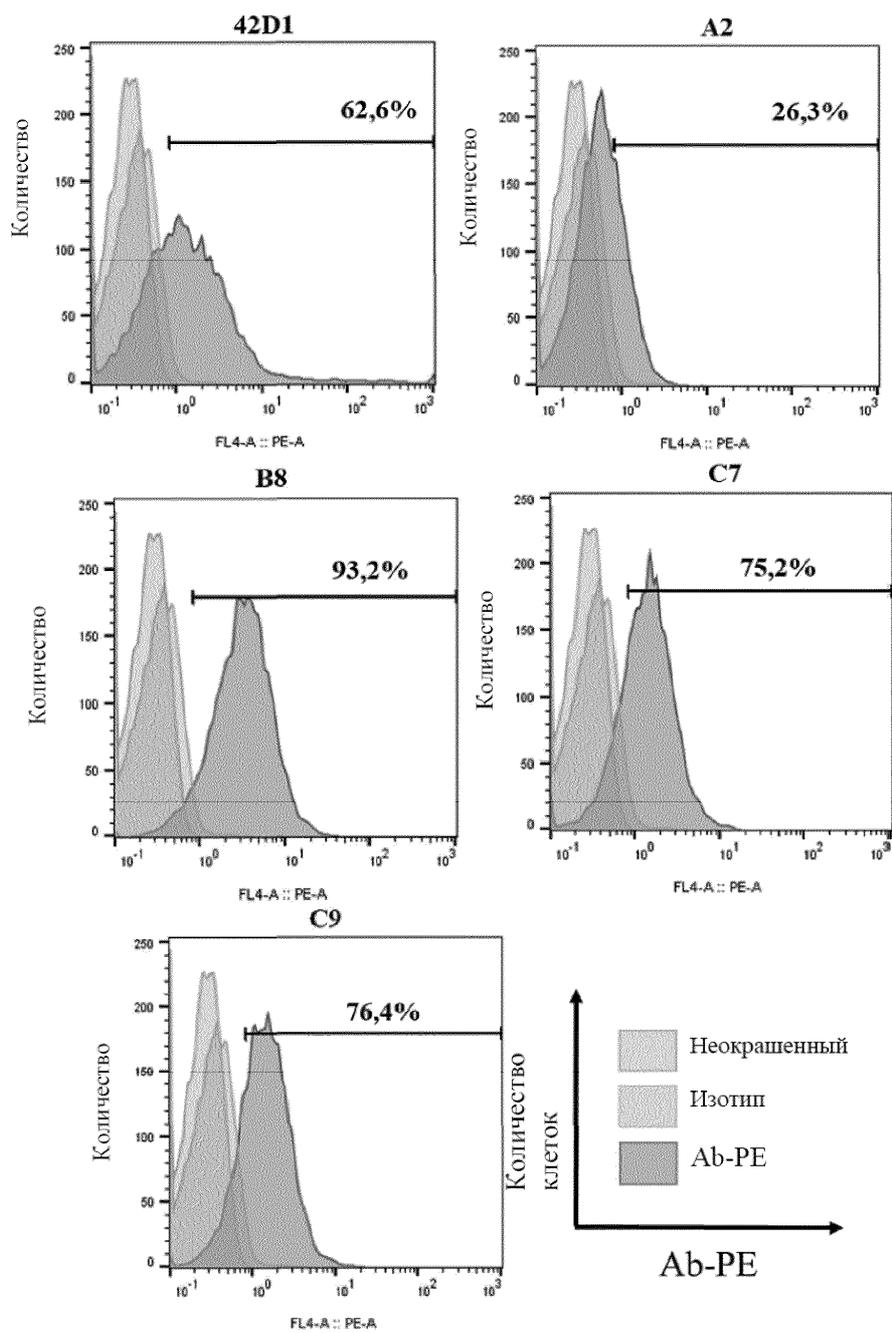
Фиг. 1



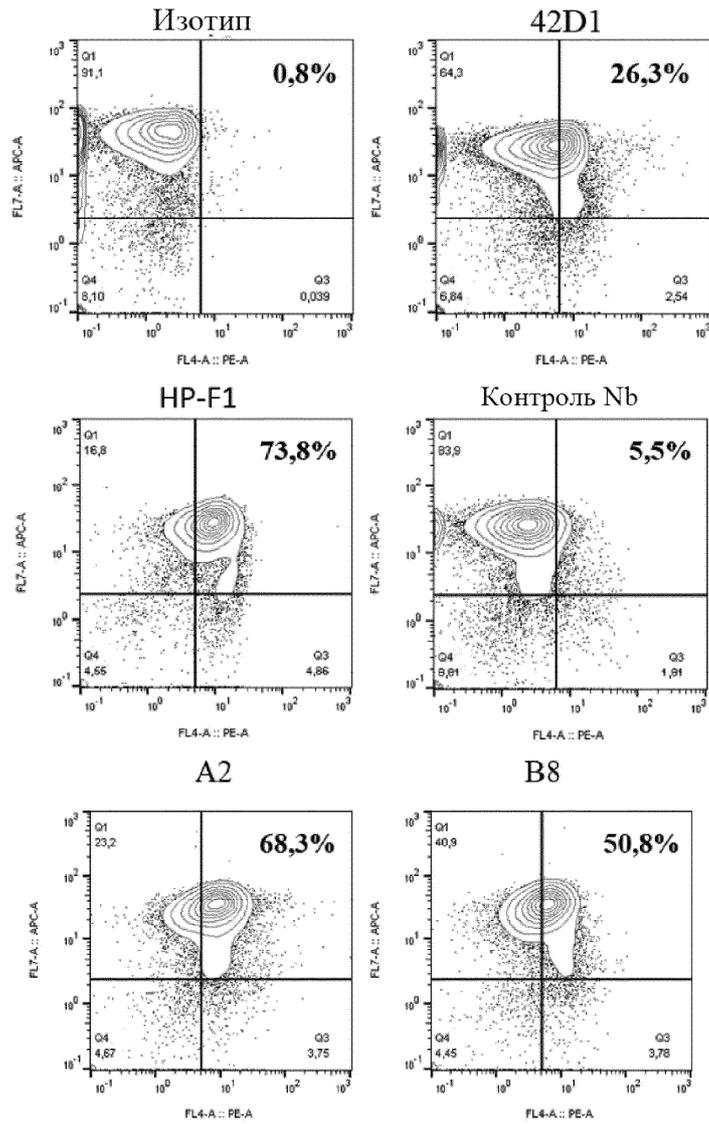
Фиг. 2



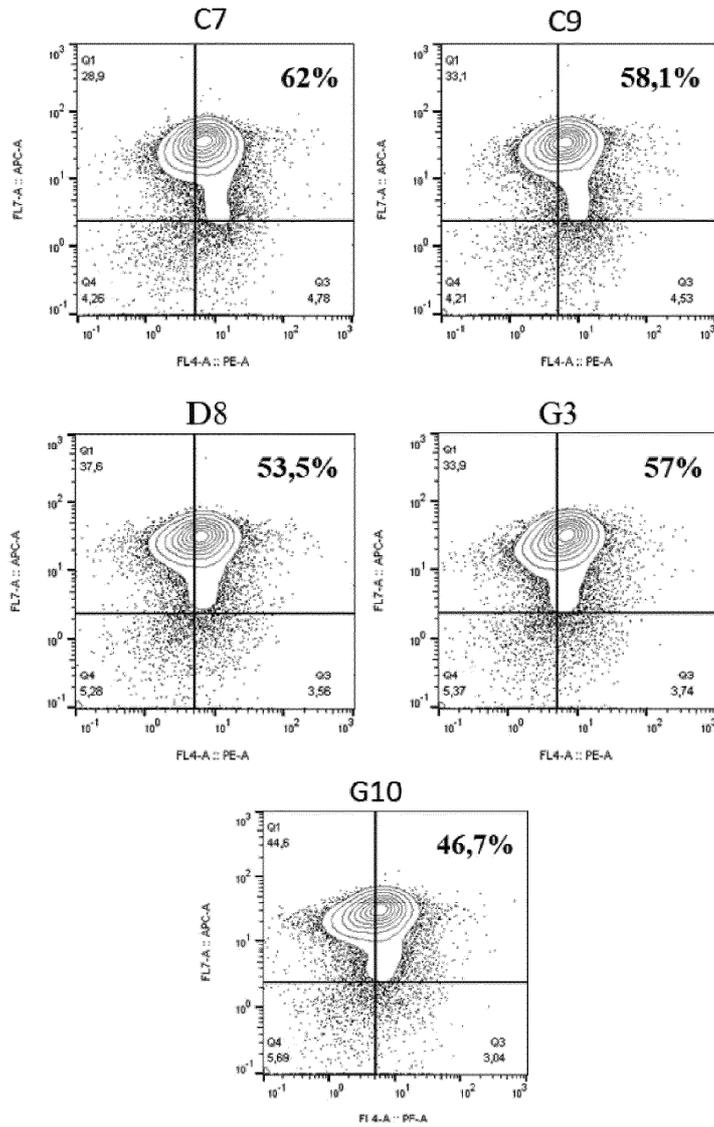
Фиг. 3



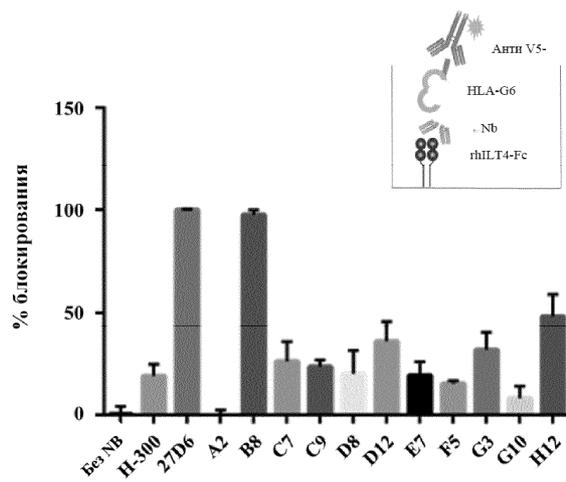
Фиг. 4



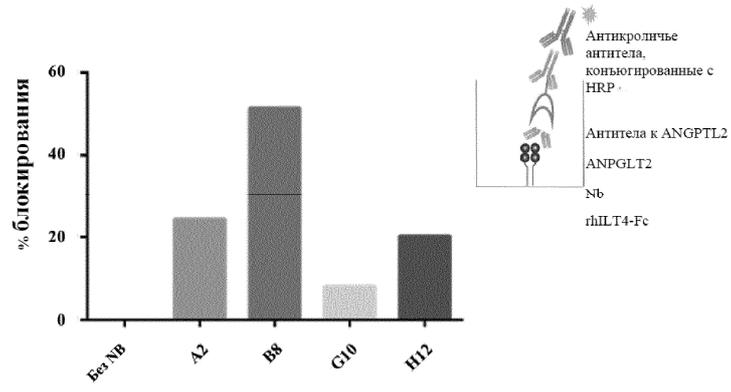
Фиг. 5



Фиг. 5 (Следующая)



Фиг. 6



Фиг. 7