(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039433 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.27

(21) Номер заявки
201991302

(22) Дата подачи заявки
2018.01.05

(51) Int. Cl. ***C07K 16/22*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ, ИНТЕРФЕРИРУЮЩИМИ С НЕТРИНОМ-1, И ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ, ИНГИБИТОРАМИ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНОГО ОТВЕТА

(31) **17305014.7**
(32) **2017.01.05**
(33) **EP**
(43) **2019.11.29**
(86) **PCT/EP2018/050289**
(87) **WO 2018/127570 2018.07.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЕТРИС ФАРМА; ЮНИВЕРСИТЕ КЛОД БЕРНАР ЛИОН 1; САНТР НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЬЕНТИФИК; САНТР ЛИОН БЕРАР; ЭНСТИТЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ (FR)

(72) Изобретатель:
Дюкаруж Бенжамен, Гольдшнайдер Давид (FR), Редавид Анна Мария Рита (IT), Жибер Бенжамен, Мелен Патрик (FR)

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

(56) WO-A1-2015104360

(57) Изобретение представляет собой комбинацию или комбинированное применение (i) соединения, способного нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, также называемого в настоящем документе нейтрализующим агентом NTN1, соединения, которое может представлять собой антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа в лечении рака. Композиция может включать антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа для применения в качестве противоракового лекарственного средства с одновременным, раздельным или последовательным введением антитела против нетрина-1 и ингибитора контрольной точки иммунного ответа пациенту.

039433 B1

039433 B1

Настоящее изобретение относится к новым комбинированным композициям и способам лечения рака.

Уровень техники

Направляющий аксон белок нетрин-1 представляет собой растворимый белок, предположительно играющий решающую роль в прогрессировании рака путем регуляции запрограммированной гибели клеток.

Действительно, рецепторы нетрина-1, такие как DCC и UNC5H (т.е. UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 и UNC5H4, также называемый UNC5A, UNC5B, UNC5C или UNC5D), принадлежат к так называемому семейству рецепторов зависимости. Эти трансмембранные рецепторы действуют двумя противоположными способами: они индуцируют положительную передачу сигналов, ведущую к пролиферации, выживанию и дифференцировке клеток в присутствии их лиганда нетрина-1. В отсутствие нетрина-1 эти рецепторы, когда не связаны, передают отрицательный сигнал, запускающий апоптоз. Сигнальный путь индукции гибели клеток при изъятии лиганда требует взаимодействия и расщепления специфическими апикальными каспазами. Как следствие, мутация сайта каспазы во внутриклеточной части рецептора предотвращает индукцию гибели клеток, наблюдаемую в отсутствие нетрина-1. Таким образом, одной точечной мутации в остатке аспарагиновой кислоты-1290 (D1290) достаточно для ингибирования DCC, вызывающего гибель клеток, без вмешательства в DCC-положительную передачу сигналов. У мышей с этой мутацией спонтанно развивается кишечная неоплазия на относительно низком уровне. При скрещивании на фоне APC^{1638N} наблюдается увеличение частоты возникновения опухолей.

Способность рецепторов зависимости вызывать апоптоз, придают им активности супрессоров опухоли. Они способны устранять клетки, которые ненормально растут в области с ограниченным количеством нетрина-1. В модели рецепторов зависимости трансформированная клетка, попавшая в среду с ограниченной концентрацией лиганда, или метастатические клетки, мигрирующие в отдаленные участки, в которых лиганд отсутствует, будут демонстрировать несвязанные рецепторы зависимости и, следовательно, подвергаться апоптозу. Этот механизм будет представлять альтернативное ограничение для онкогенеза. В агрессивных опухолях опухолевые клетки отключают индуцируемую рецепторами зависимости гибель клеток. В соответствии с этой гипотезой потеря экспрессии рецептора представляет собой избирательное преимущество для опухолевых клеток и, по-видимому, представляет собой основным способом преодоления этого защитного механизма. Многочисленные молекулярные механизмы, приводящие к потере экспрессии рецепторов зависимости при раке, связаны между собой. Экспрессия рецепторов зависимости связана с молчанием вследствие потери гетерозиготности (LOH), с помощью гиперметилирования или эпигенетического механизма, посттрансляционной модификации, такой как микроРНК и миссенс-мутации. Таким образом, ген DCC функционально заглушается LOH в 70% случаев колоректальной карциномы человека. Экспрессия рецепторов семейства UNCH5, по-видимому, подавляется при различных видах рака во многих случаях из-за метилирования промотора или мутаций.

Поскольку рецепторы зависимости вызывают гибель клеток в области, где отсутствует лиганд, дополнительный механизм спасения опухоли - это аутокринный синтез нетрина-1 опухолевыми клетками. Таким образом, экспрессия нетрина-1 связана с увеличением значительной фракции таких типов опухолей, как опухоль яичника, нейробластома, В-клеточные лимфомы, немелкоклеточный рак легкого, медуллобластома, при связанном с воспалением колоректальном раке. Кроме того, избыточная экспрессия нетрина-1 коррелирует с метастатическими и агрессивными формами рака молочной железы.

Для характеристики в качестве терапевтической мишени были проведены предварительные исследования клинической эффективности in vivo. Следовательно, молчание нетрина-1 под действием миРНК или вмешательство во взаимодействие нетрин-1/рецепторы зависимости сопутствуют апоптозу опухолевых клеток. Было охарактеризовано моноклональное антитело против нетрина-1 (HUM03) и было показано, что оно эффективно в классических моделях пролиферативного роста опухолей у мышей с иммунодефицитом (Grandin et al., Cancer Cell, 2016 и WO 2015/104360). Это антитело способно нарушать взаимодействие нетрин-1/рецепторы зависимости или опосредованную нетрином-1 димеризацию рецепторов нетрина-1.

Кроме того, нетрин-1 был недавно идентифицирован как регулятор миграции иммунных клеток, что привело к большому количеству исследований, посвященных тому, как нетрин-1 контролирует воспаление и миграцию воспалительных клеток, при нескольких патологиях, таких как: острая и хроническая болезнь почек, воспалительный артрит, атеросклероз или диабет/ожирение. Было показано, что нетрин-1 способствует развитию воспалительного артрита, атеросклерозу или ожирению путем предотвращения выхода макрофагов из воспаленных участков, из бляшек стенки артерии или путем накопления этих клеток в жировой ткани, способствуя тем самым хроническому воспалению и резистентности к инсулину. Таким образом, представляется, что нетрин-1 регулирует воспаление, но механизм, с помощью которого это происходит, неизвестен.

Иммунотерапия - это современная революция в области лечения рака с четко выраженным долгосрочным ответом, наблюдаемым у пациентов, получавших ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, в особенности, моноклональные антитела, направленные против PD1/PDL1 или CTLA4.

CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4, также известный как CD152 (кла-

стер дифференцировки 152)), представляет собой белковый рецептор, который, действуя в качестве контрольной точки иммунного ответа, подавляет иммунные реакции. CTLA4 конститутивно экспрессируется в Т-лимфоцитах-регуляторах (Tregs), но его уровень повышается только в обычных Т-лимфоцитах после активации. Он действует как выключатель, когда связан с CD80 или CD86 на клеточной поверхности антиген-презентирующих клеток (APC). Рецептор PD-1 (запрограммированная гибель клеток-1) (также известный как CD279) экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток. Его лиганды, PD-L1 (B7-H1; CD274) и PD-L2 (B7-DC; CD273) обычно экспрессируются на поверхности макрофагов или дендритных клеток. PD1 и PD-L1/PD-L2 принадлежат к семейству белков контрольных точек иммунного ответа, которые действуют как коингибирующий фактор, способный останавливать или ограничивать развитие ответа Т-клеток. Взаимодействие PD1/PD-L1 гарантирует, что иммунная система активируется только в соответствующее время, чтобы уменьшить возможность длительного аутоиммунного воспаления.

Когда PD-1 связывается с PD-L1, в Т-клетке передается отрицательный сигнал, который снижает выработку цитокинов и подавляет пролиферацию Т-клеток. Опухолевые клетки избегают этого пути в качестве механизма уклонения от обнаружения и предотвращения иммунного ответа. Описано, что PD-L1 сверхэкспрессируется опухолевыми клетками или микроокружением. PD-L1, экспрессируемый на опухолевых клетках, связывается с рецепторами PD-1 на активированных Т-клетках, что приводит к ингибированию цитотоксических Т-клеток. Эти дезактивированные Т-клетки остаются заингибированными в микроокружении опухоли. Путь PD1/PD-L1 представляет собой механизм адаптивного иммунного сопротивления, которое опухолевые клетки демонстрируют в ответ на эндогенную противоопухолевую активность. Исследования в области иммунотерапии рака направлены на преодоление способности рака блокировать иммунные реакции и на стимуляцию собственных механизмов организма, чтобы они сохраняли эффективность против рака.

Тем не менее, сообщалось о двух основных ограничениях:

Основное ограничение заключается в эффективности соединений, поскольку только у части пациентов наблюдали ответ на данные ингибиторы контрольной точки иммунного ответа (могли не отвечать на ингибитор контрольной точки иммунного ответа). Таким образом, только 50% пациентов с меланомой демонстрируют объективные ответы на комбинационную блокаду CTLA4 и PD1, и этот процент падает до ~20% при немелкоклеточном раке легкого и до <5% при раке молочной железы или толстой кишки.

Второе ограничение заключается в том, что до сих пор невозможно предсказать, будет ли пациент отвечать положительно или нет. Обилие иммунных эффекторов (и в особенности, CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты, CTL) в сочетании с дефицитом иммуносупрессивных клеток (в частности, FOXP3+ регуляторные Т-клетки, Tregs) в ложе опухоли представляет собой важным, но несовершенный прогностический фактор. В различных сообщениях предполагают, что химиотерапия может усиливать действие иммуноонкологических лекарственных препаратов, в особенности, потому что некоторые цитотоксические агенты могут стимулировать иммуногенную гибель клеток (ICD) в злокачественных клетках, следовательно, способствуя их иммунному распознаванию. Представляет собой ли гибель клеток, вызванная вмешательством нетрин-1, иммуногенной, пока неизвестно. Более того, хотя было показано, что нетрин-1 действует как фактор выживания при прогрессировании рака, в условиях, не связанных с раком, недавно было показано, что нетрин-1 может действовать как сигнал иммунного наведения для Т-клеток или макрофагов, несмотря на то, что описанные данные были противоречивы (Ramkhelawon et al., Nature Med, 2013: Boneschansker et al., J. Immunology, 2016). Известно, что различные хемокины, продуцируемые опухолевой тканью, такой как CXCL12, рекрутируют иммуносупрессивные клетки, такие как Treg, и иммуносупрессорные клетки миелоидного происхождения. Эти клетки высвобождают различные медиаторы, которые нарушают функцию цитотоксических Т-клеток и дендритных клеток, таких как TGF-бета (трансформирующий фактор роста-бета), IL10 (интерлейкин-10) и VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста), генерируя иммунотолерантное микроокружение. Сообщалось, что все эти секретируемые белки связаны с нетрином-1. Действительно, было показано, что (i) нетрин-1 специфически стимулирует хемотаксис CXCL12, (ii) IL-10 облегчает разрастание нейритов за счет увеличения экспрессии нетрина-1, (iii) существует связь между TGF-бета и нетрином-1 и (iv) существует связь между VEGF и нетрином-1, поскольку нетрин-1 стимулирует ангиогенез in vivo и усиливает реакцию на фактор роста эндотелия сосудов.

Раскрытие изобретения

Эффект комбинации лекарств по своей природе непредсказуем. Часто бывает, у одного лекарства существует склонность частично или полностью подавлять действие другого. Настоящее изобретение основано на неожиданном наблюдении значительного увеличения выживаемости ксенотрансплантированных мышей и более продолжительного контроля заболевания с помощью комбинированной терапии с применением HUM03, антитела против нетрина-1, и моноклонального антитела против CTLA4 или PD-1. Полученные данные подтверждают мнение о том, что комбинирование моноклонального антитела, направленного против нетрина-1, с современными иммунотерапевтическими средствами повышает их эффективность. В поисках механизма, который может объяснить это усиленное действие ингибиторов контрольной точки иммунного ответа при наличии вмешательства нетрина-1, мы проанализировали опухо-

левый иммунный инфильтрат, полученный в ответ на монотерапию или комбинированное лечение. Как показано на рисунке 5, хотя монотерапия (HUM03 или CTLA4) не оказывает существенного влияния на отношение эффектор Т-клеток/регулятор Т-клеток, комбинация сдвигает отношение в сторону эффекторов Т-клеток. Это подтверждает повышенную эффективность, предполагая, что комбинация усиливает присутствие лимфоидных клеток-киллеров (эффектора Т-клеток).

Цель изобретения представляет собой комбинацию или комбинированное применение (i) соединения, способного нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, также называемого здесь нейтрализующим агентом NTN1, соединение, которое может представлять собой антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа при лечении рака.

Еще одна цель изобретения представляет собой комбинацию или комбинированное применение антитела, связывающегося с нетрином-1, или антитела против нетрина-1, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, при лечении рака.

Еще одна цель изобретения представляет собой композицию, включающую (i) соединение, способное нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, причем это соединение может представлять собой антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитор контрольной точки иммунного ответа, для применения в качестве противоракового лекарственного средства при одновременном, раздельном или последовательном введении соединения (i) и ингибитора контрольной точки иммунного ответа (ii) пациенту.

Еще одна цель изобретения представляет собой композицию, включающую (i) антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитор контрольной точки иммунного ответа, для применения в качестве противоракового лекарственного средства с одновременным, раздельным или последовательным введением антитела против нетрина-1 и контрольной точки ингибитора иммунного ответа пациенту.

Еще одна цель изобретения представляет собой также способ комбинированного противоракового лечения, включающий введение пациенту (i) соединения, способного нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, соединение, которое может представлять собой антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

Еще одна цель изобретения представляет собой также способ комбинированного противоракового лечения, включающий введение пациенту (i) антитела, связывающегося с нетрином-1, или антитела против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

Еще одна цель изобретения представляет собой способ модуляции опухолевого инфильтрата (т.е. лимфоцитов Т или В, макрофагов, естественных клеток-киллеров) in vivo, включающий введение пациенту (i) соединения, способного нарушать или препятствовать взаимодействие нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, соединение, которое может представлять собой антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

Еще одна цель изобретения представляет собой способ модуляции опухолевого инфильтрата (т.е. лимфоцитов Т или В, макрофагов, естественных клеток-киллеров) in vivo, включающий введение пациенту (i) антитела, связывающегося с нетрином-1, или антитела против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

Еще одна цель изобретения представляет собой активацию иммунного ответа путем стимуляции гибели раковых клеток или иммуногенной гибели клеток, которая включает введение пациенту (i) соединения, способного нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, соединения, которое может представлять собой антитело, связывающееся с нетрином-1, или антитело против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

Еще одна цель изобретения представляет собой активацию иммунного ответа путем стимуляции гибели раковых клеток или иммуногенной гибели клеток, которая включает введение пациенту (i) антитела, связывающегося с нетрином-1, или антитела против нетрина-1, и (ii) ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

Другие конкретные цели изобретения представляют собой:

фармацевтическая композиция, включающая антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, в которой антитело против нетрина-1 способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, для применения в способе лечения рака;

фармацевтическая композиция, включающая антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, в которой антитело против нетрина-1 специфически связывается с полипептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35, и способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецепто-

ра;

фармацевтическая композиция, включающая антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, в которой антитело против нетрина-1 включает (i) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7, и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9, или (ii) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30, и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9;

фармацевтическая композиция, включающая антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, в которой антитело против нетрина-1 способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, и ингибитор контрольной точки иммунного ответа выбирают из группы, состоящей из антител против PD1, PD-L1, PD-L2 и CTLA-4;

способ противоракового лечения, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против нетрина-1 и ингибитора контрольной точки иммунного ответа, в котором антитело против нетрина-1 способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора.

В воплощении раки, подлежащие лечению, представляют собой раки с экспрессией нетрина-1 и рак, который может не отвечать на ингибитор контрольной точки иммунного ответа (раздельно, т.е. если не в комбинации с антителом против нетрина-1 и ему подобного).

Эти различные цели, в особенности, могут быть достигнуты с применением антитела HUM03 или одного из его родительских антител, как это будет представлено в дальнейшем.

В этих различных предметах изобретения ингибитор контрольной точки иммунного ответа может представлять собой или включать, в особенности, антитело, предпочтительно, моноклональное антитело.

Осуществление изобретения

HTH1 (нетрин-1) нейтрализующее средство

NTN1 нейтрализующее средство представляет собой лекарственное средство, которое препятствует нетрину-1 взаимодействовать с рецептором нетрина-1, или которое мешает нетрину-1 вызывать димеризацию или мультимеризацию рецептора нетрина-1. В настоящем документе его называют соединением, способным нарушать или препятствовать взаимодействию нетрина-1 и рецептора зависимости или димеризации рецептора зависимости. Специалист в данной области техники может обратиться к WO 2007/099133, включенной в настоящий документ путем отсылки, которая раскрывает интерференцию между нетрином-1 и его рецепторами, либо снижение или ингибирование взаимодействия или связывания между нетрином-1 и рецепторами, или снижение или ингибирование способности нетрина-1 вызывать димеризацию или мультимеризацию (для простоты мы ссылаемся в настоящем документе на димеризацию, которая может включать в себя мультимеризацию) рецептора нетрина-1, что способствует индуцируемому рецепторами нетрина-1 апоптозу.

В воплощении, нейтрализующий агент NTN1 представляет собой небольшую интерферирующую РНК или миРНК, которая представляет собой двухцепочечную РНК (дцРНК) (которые, в частности, могут иметь длину от 10 до 50 нуклеотидов) и который уменьшает экспрессию гена, кодирующего нетрин-1. Части первой цепи комплементарны целевому гену, т.е. он обладает достаточной комплементарностью для гибридизации с целевым геном. Например, имеет место по крайней мере 80% идентичности с целевым геном или его частью. AP: номер доступа мРНК человеческого нетрина-1: NM_004822. Последовательность миРНК, которую можно применять: аминокислоты 94-114 с последовательностью NM_004822.

Во втором воплощении, нейтрализующий агент NTN1 представляет собой молекулу (например, антитело, полипептид, малую молекулу и т.п.), которая связывается с нетрином-1, и нетрин-1 теряет способность связываться со своими рецепторами или индуцировать димеризацию/мультимеризацию рецепторов нетрина-1, в особенности, DCC и/или UNC5.

В третьем воплощении, нейтрализующий агент NTN1 представляет собой молекулу (например, антитело, полипептид, малую молекулу и т.п.), которая связывается с рецептором нетрина-1, данное связывание ингибирует связывание NTN1 с рецептором или димеризацию/мультимеризацию рецептора.

Нейтрализующий агент NTN1 может индуцировать апоптоз, опосредованный рецептором NTN1.

Рецепторы нетрина-1 могут, в особенности, представлять собой DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C или UNC5D, неогенин и A2b.

В предпочтительном воплощении нейтрализующий агент NTN1 представляет собой антитело, связывающееся с нетрином-1.

Антитела против NTN1 (антитело против нетрина-1 или антитело, связывающееся с нетрином-1)

Предпочтительно, с нетрином-1 специфически связывается поликлональное или моноклональное антитело. Антитело предпочтительно способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора (т.е. рецепторов нетри-

на-1, включая UNC5B, A, C, D, DCC, неогенин и A2b).

Поликлональные антитела NTN1 могут, среди прочего, быть получены путем иммунизации животного, такого как кролик, мышь и им подобного, с помощью выбранной аминокислотной последовательности, сбора и затем истощения антисыворотки, полученной, например, на иммуноадсорбенте, содержащем рецептор, в соответствии со способами, известными per se специалисту в данной области техники.

Аминокислотная последовательность нетрина-1 показана на SEQ ID NO: 1, и нетрин-1 можно применять полностью или частично для конструирования антител.

Как правило, моноклональные антитела могут быть получены в соответствии с общепринятым способом слияния лимфоцитов и гибридомной культуры, описанным Köhler и Milstein (Nature, 1975, 256 (5517): 495-7). Другие способы получения моноклональных антител также известны (Harlow et al., ed., 1988 "Antibodies: a laboratory manual"). Моноклональные антитела могут быть получены путем иммунизации млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика или даже человека и т.п.) и с применением способа слияния лимфоцитов, приводящего к гибридоме (Köhler и Milstein, 1975). Существуют альтернативные методы к этой общепринятой технике. Например, можно продуцировать моноклональные антитела путем экспрессии нуклеиновой кислоты, клонированной из гибридомы. Также возможно получать антитела с помощью способа фагового дисплея, вводя кДНК для антител в векторы, которые обычно представляют собой нитевидные фаги, демонстрирующие библиотеки генов V на поверхности фага (например, fUSE5 для E. coli, Scott J.K., Smith G.P. Science 1990; 249:386-390). Протоколы для конструирования таких библиотек антител описаны в работе J.D. Marks et al. (J. Mol. Biol., 222 (1991), p. 581). кДНК, соответствующая полноразмерному нетрину-1 с сигнальной последовательностью (SEQ ID NO: 2) или его подходящему фрагменту, может быть применена для получения моноклональных антител в соответствии с этими способами.

В предпочтительном воплощении, нейтрализующее NTN1 антитело представляет собой антитело, раскрытое в WO 2015/104360, ссылка, на которую включена в настоящий документ путем отсылки. Это антитело, которое специфически связывается с эпитопом NTN1 или полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 35, или его вариантом. Данные антитела обладают свойством связываться с NTN1 и вызывать гибель или апоптоз опухолевой клетки через рецептор нетрина-1, такой как рецептор UNC5 или DCC. Данные антитела предпочтительно представляют собой моноклональные антитела. Данные антитела способны нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредуемой нетрином-1 димеризации. Различные производные формы антител (включая фрагменты и их комбинации) будут описаны ниже в настоящем документе.

В воплощении, основанном на определении CDR по IMGT, антитело включает CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9. Основываясь на определении CDR по Кабату, антитело включает CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9.

В первой серии воплощений антитело согласно изобретению включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 11, 12 или 13. Как правило, оно включает обе последовательности SEQ ID NO: 10 и 11, или SEQ ID NO: 12 и 13.

Во второй серии воплощений, антитело представляет собой гуманизированное антитело. Предпочтительно оно включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: от 14 до 19 (VL) и/или из группы, состоящей из SEQ ID NO: от 20 до 27 (VH). Как правило, оно представляет собой гуманизированное антитело и включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: от 14 до 19, и аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: от 20 до 27.

Конкретные воплощения представляют собой следующие гуманизированные антитела. Первое из перечисленных в этой таблице соответствует пересадке мышиных CDR на человеческий IgG1. Другие, называемые HUM, представляют собой моноклональные антитела, имеющие вариабельные каркасные области человека. В воплощении, в изобретении применяют, или композиции согласно изобретению включают, HUM01, HUM02, HUM03, HUM04, HUM05, HUM06, HUM07, HUM08, HUM09 и/или HUM10. В типичном воплощении, применяют HUM03. В табл. 1 приведены также отсылки на CH и CL человеческого IgG1:

Таблица 1

	VH SEQ ID NO:	Константная область тяжелой цепи	VL SEQ ID NO:	Константная область легкой цепи
CDR-пересадка (мышиные CDRs, привитые на VH или VL IgG1 человека)	27	IgG1 человека (GenBank: AEL33691.1 модифицированный R97K)	19	IgG1 человека (GenBank: CAC20459.1)
HUM01	20	IgG1 человека	14	IgG1 человека
HUM02	21	IgG1 человека	15	IgG1 человека
HUM03	22	IgG1 человека	16	IgG1 человека
HUM04	23	IgG1 человека	17	IgG1 человека
HUM05	24	IgG1 человека	17	IgG1 человека
HUM06	25	IgG1 человека	16	IgG1 человека
HUM07	26	IgG1 человека	17	IgG1 человека
HUM08	22	IgG1 человека	17	IgG1 человека
HUM09	25	IgG1 человека	18	IgG1 человека
HUM10	21	IgG1 человека	16	IgG1 человека

Полипептид рецептора NTN1

В другом воплощении, лекарственное нейтрализующее NTN1 (нетрин-1) средство представляет собой соединение, включающее внеклеточный домен рецептора нетрина-1 или фрагмент указанного внеклеточного домена. Например, аминокислотная последовательность внеклеточного домена рецептора нетрина-1 или фрагмента указанного внеклеточного домена приведена в идентификаторе последовательностей UniProt (UniProt Sequence ID) [диапазон позиций внеклеточного домена]:UNC5A:Q6ZN44 [аминокислоты 26-306 или фрагмент 34-240]; UNC5B:Q8IZJ1 [аминокислоты 27-377 или фрагмент 29-244]; UNC5C:O95185 [аминокислоты 41-380 или фрагмент 61-258]; UNC5D:Q6UXZ4 [аминокислоты 33-379]; DCC:P43146 [аминокислоты 26-1097]. Данное лекарственное средство способно связываться с нетрином-1. Рецепторы нетрина-1 могут представлять собой DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C или UNC5D.

В воплощении, внеклеточный домен или его часть связан с Fc-частью антитела. В предпочтительном воплощении Fc-часть представляет собой Fc или его часть IgG человека. Человеческий IgG может, в частности, представлять собой IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. В предпочтительном воплощении IgG представляет собой IgG1.

В воплощении слитый белок представляет собой одноцепочечный белок, что означает, что белок сделан из фрагмента DCC или UNC5, включающего или состоящего, соответственно, из четвертого или пятого фибронектинподобного домена DCC или из двух Ig-подобных доменов UNC5 и из пептидной или белковой последовательности, улучшающей фармацевтические параметры соединения.

В другом предпочтительном воплощении слитый белок представляет собой двухцепочечный белок. Это означает, что слитый белок состоит из двух цепей, каждая из которых включает или состоит, соответственно, из четвертого или пятого фибронектинподобного домена DCC или из двух Ig-подобных доменов UNC5 и из Fc-части антитела, в котором обе цепи связаны друг с другом, предпочтительно, одной или несколькими, например, двумя, дисульфидными связями.

В воплощении лекарственное средство включает пятый домен фибронектина (Fn5 или 5Fbn) из DCC. Предпочтительно лекарственное средство включает DCC-слитый белок, включающий данный Fn5, слитый с Fc-частью антитела. В предпочтительном воплощении Fc-часть представляет собой Fc или его часть из IgG человека. IgG человека может, в частности, представлять собой IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. В предпочтительном воплощении IgG представляет собой IgG1. Ген DCC доступен, например, из NCBI, под ID 1630 (по состоянию на 14 июля 2012), он кодирует белок рецептора DCC как Uniprot P43146, по состоянию на 11 июля 2012 г. DCC-слитый белок, примененный в изобретении и включающий Fn5, описан в WO 2012025618, включенной в настоящий документ путем отсылки. В воплощении слитый белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3 или 4 в WO 2012025618. В воплощении слитый белок кодируется последовательностью ДНК SEQ ID NO: 1 в WO 2012025618. Другие примеры слитых белков, включающих Fn5, представляют собой белок DCC-5-фибронектин, слитый с глутатион-S-трансферазой (DCC-5Fbn-GST), описанный в WO 2007099133.

В воплощении, лекарственное средство включает два Ig-подобных домена UNC5. Предпочтительно лекарственное средство включает UNC5-слитый белок, включающий два Ig-подобных домена UNC5, слитые с Fc-частью антитела. IgG человека может, в частности, представлять собой IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. В предпочтительном воплощении IgG представляет собой IgG1. В воплощении UNC5 представляет собой UNC5A. В другом воплощении UNC5 представляет собой UNC5B. В другом воплощении UNC5 представляет собой UNC5C. Еще в одном воплощении UNC5 представляет собой UNC5D.

В воплощении белок UNC5A в слитой конструкции с UNC5A включает или состоит из аминокислот с 20 до 217 в SEQ ID NO: 1 в WO 2014/041088, данный документ включен в настоящий документ путем отсылки. Данный слитый белок может дополнительно включать Fc IgG1, включающий или состоящий из аминокислот с 220 до 446 данной SEQ ID NO: 1. Данный Fc сливают с белком UNC5A, например, через линкер, такой как GT. В воплощении, настоящее изобретение относится к белку UNC5A в

составе слитого с UNC5A белка, включающему или состоящему из аминокислотной последовательности данной SEQ ID NO: 1: последовательность сигнального пептида Kappa2: аминокислоты с 1 до 19; Ig-подобные домены из UNC5A: аминокислоты с 20 до 217; Линкер: аминокислоты 218-219; Fc IgG1 человека: аминокислоты от 220 до 446. В воплощении зрелый слитый белок не включает последовательность сигнального пептида Kappa2. В предпочтительном воплощении слитый белок представляет собой двухцепочечный белок. Настоящее изобретение также охватывает вариантные последовательности, имеющие процент идентичности, который равен или превышает 90%, предпочтительно превышает 96, 95, 94, 93, 92 или 91%, по всей длине аминокислотной последовательности 20-217, или аминокислот 20-446 данной SEQ ID NO: 1. Аминокислотные замены могут, например, иметь место в одном или нескольких положениях 9, 72, 74, 87, 144, 164, 170, 193 и/или 210 по всей длине аминокислотной последовательности 20-217 или данной SEQ ID NO: 1.

В другом воплощении белок UNC5B в составе слитого с UNC5B белка включает или состоит из аминокислот с 20 по 215 из SEQ ID NO: 2 в WO 2014/041088. Данный слитый белок может дополнительно включать Fc IgG1, включающий или состоящий из аминокислот с 218 по 444 данной SEQ ID NO: 2. Данный Fc сливают с белком UNC5B, например, через линкер, такой как GT. В воплощении, настоящее изобретение относится к белку UNC5B в составе слитого с UNC5B белка, включающему или состоящему из аминокислотной последовательности данной SEQ ID NO: 2: последовательность сигнального пептида Kappa2: аминокислоты от 1 до 19; Ig-подобные домены UNC5B: аминокислоты от 20 до 215; Линкер: аминокислоты 216-217; Fc IgG1 человека: аминокислоты от 218 до 444. В воплощении зрелый слитый белок не включает последовательность сигнального пептида Kappa2. В предпочтительном воплощении слитый белок представляет собой двухцепочечный белок. Настоящее изобретение охватывает вариантные последовательности, имеющие процент идентичности, который равен или превышает 90%, предпочтительно, превышает 96, 95, 94, 93, 92 или 91%, на всей длине аминокислотной последовательности 20-215, или аминокислот 20-444 данной SEQ ID NO: 2. Аминокислотные замены могут, например, иметь место в одном или нескольких положениях 29, 74, 100, 109, 113, 146, 149, 155, 172, 184, 189, 201, 213 и/или 214 на всей длине аминокислотной последовательности 20-215, или данной SEQ ID NO: 2.

Еще в одном воплощении белок UNC5C в составе UNC5C-слитого белка включает или состоит из аминокислот от 20 до 217 из SEQ ID NO: 3 в WO 2014/041088. Данный слитый белок может дополнительно включать Fc IgG1, включающий или состоящий из аминокислот от 220 до 446 данной SEQ ID NO: 3. Данный Fc сливают с белком UNC5C, например, через линкер, такой как GT. В воплощении настоящее изобретение относится к белку UNC5C в составе UNC5C-слитого белка, включающему или состоящему из аминокислотной последовательности данной SEQ ID NO: 3: Последовательность сигнального пептида Kappa2: аминокислоты от 1 до 19; Ig-подобные домены UNC5C: аминокислоты от 20 до 217; Линкер: аминокислоты 218-219; Fc IgG1 человека: аминокислоты от 220 до 446. В воплощении зрелый слитый белок не включает последовательность сигнального пептида Kappa2. В предпочтительном воплощении слитый белок представляет собой двухцепочечный белок. Настоящее изобретение охватывает вариантные последовательности, имеющие процент идентичности, который равен или превышает 90%, предпочтительно, превышает 96, 95, 94, 93, 92 или 91%, на всей длине аминокислотной последовательности 20-217, или аминокислот 20-446 данной SEQ ID NO: 3. Аминокислотные замены могут, например, иметь место в одном или нескольких положениях 33, 66, 109, 129, 136, 178, 189 и/или 211 на всей длине аминокислотной последовательности 20-217, или данной SEQ ID NO: 3.

Еще в одном воплощении белок UNC5D в составе UNC5D-слитого белка включает или состоит из аминокислот от 20 до 217 из SEQ ID NO: 4 в WO 2014/041088. Слитый белок может дополнительно включать Fc IgG1 включающий или состоящий из аминокислот от 220 до 446 данной SEQ ID NO: 4. Данный Fc сливают с белком UNC5D, например, через линкер, такой как GT. В воплощении, настоящее изобретение относится к белку UNC5D в составе UNC5D-слитого белка, включающему или состоящему из аминокислотной последовательность данной SEQ ID NO: 4: Последовательность сигнального пептида Kappa2: аминокислоты от 1 до 19; Ig-подобные домены UNC5D: аминокислоты от 20 до 217; Линкер: аминокислоты 218-219; Fc IgG1 человека: аминокислоты от 220 до 446. В воплощении зрелый слитый белок не включает последовательность сигнального пептида Kappa2. В предпочтительном воплощении слитый белок представляет собой двухцепочечный белок. Настоящее изобретение охватывает вариантные последовательности, имеющие процент идентичности, который равен или превышает 90%, предпочтительно превышает 96, 95, 94, 93, 92 или 91%, на всей длине аминокислотной последовательности 20-217, или аминокислот 20-446 данной SEQ ID NO: 4. Аминокислотные замены могут, например, иметь место в одном или нескольких положениях 38, 79, 80, 115, 131, 178, 186, 201 и/или 212 на всей длине аминокислотной последовательности 20-217, или данной SEQ ID NO: 4.

Изобретение может обеспечивать введение нуклеиновой кислоты, кодирующей данные полипептиды, а не сам полипептид. Векторы, способные экспрессировать полипептид у пациента, могут быть применены как обычно. Специалисты в данной области техники могут быть направлены к WO 2007/099133 и WO 2014/041088, которые описывают векторы и способы получения векторов и их применения, которые можно применять при осуществлении настоящего изобретения.

Ингибиторы контрольных точек

В одном из аспектов ингибитор контрольной точки иммунного ответа представляет собой биологическое терапевтическое средство или небольшую молекулу. В другом аспекте ингибитор контрольной точки представляет собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело, слитый белок или их комбинацию. Антитело может быть направлено против любого белка, который участвует в данном пути, и, в особенности, против рецептора или лиганда. Как известно, ингибитор контрольной точки иммунного ответа способен восстанавливать иммунный ответ на раковые клетки. В особенности, ингибитор нарушает или препятствует, или подавляет, взаимодействие между взаимодействующими белками и позволяет осуществить иммунный ответ, в особенности, Т-клеткам, убивающим опухолевые клетки. В дополнительном аспекте ингибитор контрольной точки иммунного ответа ингибирует белок контрольной точки иммунного ответа, который может представлять собой CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 или их комбинацию. В дополнительном аспекте ингибитор контрольной точки иммунного ответа взаимодействует с лигандом белка контрольной точки иммунного ответа, который может представлять собой CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 или их комбинацию.

Анти-PD1, анти-PD-L1 и анти-PD-L2 антитела

В изобретение применяют антитела, которые блокируют, ингибируют или ослабляют путь PD1/PD-L1 и/или PD1/PD-L2.

В настоящее время существует по меньшей мере пять средств, блокирующих путь, которые есть в продаже или проходят клиническую оценку, любой из них может быть полезен в сочетании с изобретением. Данные средства представляют собой BMS-936558 (анти-PD-L1 mAb, ниволумаб/ONO-4538, Bristol-Myers Squibb, бывший MDX-1106 (антитело 5C4 в WO 2006/121168), MK-3475 (анти-PDl mAb, ламбролизумаб или пембролизумаб, Keytruda®, Merck), MPDL3280A/RG7446 (анти-PD-L1 mAb, Roche/Genentech), AMP-224 (иммуноадгезин, включающий анти-PD-L2, амплиммун и GSK), пидилизумаб (анти-PD1 mAb, CT-011, CureTech/TEVA - WO 2009/101611).

Для ДНК-конструкций MK-3475, кодирующих вариабельные области тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител, h409A-I 1 было депонировано в Патентном депозитарии Американской коллекции типовых культур. (10801 University Bld., Manassas, VA). Плазмида, содержащая ДНК, кодирующую тяжелую цепь h409A-I 1, была депонирована 9 июня 2008 г. и идентифицирована как 081469_SPD-H, а плазмида, содержащая ДНК, кодирующую легкую цепь h409AI 1, была депонирована 9 июня 2008 г. и идентифицирована как 0801470_SPD-LI 1.

Кроме того известно, что антитела PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают AMP-224 (слитый белок B7-DC/IgG1, лицензированный для GSK), AMP-514 описан в WO 2012/145493, антитело MEDI-4736 (анти-PD-L-1 разработанное в AstraZeneca/Medimmune) описано в WO 2011/066389 и US 2013/034559, антитело YW243.55.S70 (анти-PD-L1) описан в WO 2010/077634, MDX-1105, также известно как BMS-936559, представляет собой анти-PD-L1 антитело, разработанное в Bristol-Myers Squibb, описано в WO 2007/005874, и антитела и ингибиторы описаны в WO 2006/121168, WO 2009/014708, WO 2009/114335 и WO 2013/019906. Раскрытие любого документа, упомянутого в настоящем документе, тем самым включено посредством отсылки. Дополнительные примеры анти-PD1 антитела раскрыты в WO 2015/085847, например антитела, имеющие вариабельный домен легкой цепи CDR1, 2 и 3 из SEQ ID N0:6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и вариабельный домен тяжелой цепи CDR1, 2 и 3 антитело из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, соответственно, в котором отсылка к SEQ ID NO представляет собой нумерация согласно WO 2015/085847.

Анти-CTLA-4 антитела

CTLA-4 (цитотоксический ассоциированный с Т-лимфоцитами белок 4), также известный как CD152 представляет собой другой член семейства ингибиторов рецепторов CD28, и экспрессируется на Т-клетках. Антитела, которые связывают и подавляют CTLA-4, известны в данной области техники.

В одном примере антитело представляет собой ипилимумаб (торговое наименование Yervoy®, Bristol-Myers Squibb), антитело IgG человека.

Каждый из этих ингибиторов контрольной точки иммунного ответа, в особенности каждый из этих антител против PD1, PD-L1 или 2 или против CTLA-4 или природного партнера по связыванию или лиганда, может быть скомбинирован или применен с одним из моноклональных антител, раскрытых в настоящем документе в табл. 1, в особенности, HUM01, HUM02, HUM03, HUM04, HUM05, HUM06, HUM07, HUM08, HUM09 и/или HUM10. В воплощении, комбинируют или применяют с HUM03.

Определения и дополнительные воплощения, варианты и альтернативы изобретения:

Как применено в настоящем документе, последовательность "по меньшей мере, на 85% идентичная эталонной последовательности" представляет собой последовательность, имеющая по всей длине 85% или более, в особенности 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентичности последовательности со всей длиной эталонной последовательно.

Процент "идентичности последовательности" может быть определен путем сравнения двух после-

довательностей, оптимально выровненных по окну сравнения, причем часть полипептидной последовательности в окне сравнения может включать вставки или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не включает вставки или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения числа позиций, в которых идентичный аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих позиций, деления количества совпадающих позиций на общее количество позиций в окне сравнения и умножения результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения проводится глобальным попарным выравниванием, например, с применением алгоритма Needleman и Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443. Процент идентичности последовательности можно легко определить, например, с помощью программы Needle с матрицей BLOSUM62, и со следующими параметрами: штраф за внесение пропуска = 10, штраф за продолжение пропуска = 0,5.

В контексте изобретения "консервативная аминокислотная замена" - это замена, при которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим группу боковой цепи с аналогичными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Группы консервативных аминокислотных замен: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин-триптофан, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

На протяжении всей заявки термин "включающий" следует толковать как охватывающий все конкретно упомянутые функции, а также необязательные, дополнительные, неуказанные функции. Как применено в настоящем документе, применение термина "включающий" также раскрывает воплощение, в котором нет никаких признаков, кроме специально упомянутых признаков, (т.е. "состоящий из").

"Антитело" может представлять собой природное или общепринятое антитело, в котором две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями, а каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью. Существует два типа легких цепей: лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелых цепей (или изотипов), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит домены с различной последовательностью. Легкая цепь включает в себя два домена или области, вариабельный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь включает в себя четыре домена, вариабельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, вместе называемые CH). Вариабельные области как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей определяют узнавание и специфичность связывания с антигеном. Домены константной области легкой (CL) и тяжелой (CH) цепей придают важные биологические свойства, такие как ассоциация цепи антитела, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из вариабельных участков одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между антигенсвязывающим сайтом антитела и антигенной детерминантой. Сайты связывания антитела состоят из остатков, которые в основном происходят из гипервариабельных или определяющих комплементарность областей (CDR). Иногда остатки из не гипервариабельных или каркасных областей (FR) влияют на общую доменную структуру и, следовательно, на сайт связывания.

"Области, определяющие комплементарность" или "CDRs" относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность связывания и специфичность природной области Fv сайта связывания нативного иммуноглобулина. Каждая легкая и тяжелая цепи иммуноглобулина имеют три CDR, обозначаемые как CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, соответственно. Следовательно, обычный антигенсвязывающий сайт антитела включает шесть CDR, включающих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

Термин "каркасные области" (FRs) относится к аминокислотным последовательностям, вставленным между CDR, т.е. к тем частям вариабельных областей легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, которые относительно консервативны среди разных иммуноглобулинов одного вида. Каждая легкая и тяжелая цепи иммуноглобулина имеют четыре FR, обозначаемые FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, соответственно.

Как применено в настоящем документе, "каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая практически идентична (около 85% или более, в особенности 90, 95, 97, 99% или 100%) каркасной области природного антитела человека.

В контексте изобретения, определение CDR/FR в легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина должно быть основано на определении IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol. 27(1): 55-77;

www.imgt.org).

Как применено в настоящем документе, термин "антитело" обозначает обычные антитела и их фрагменты, а также однодоменные антитела и их фрагменты, в особенности, вариабельной области тяжелой цепи однодоменных антител, и химерные, гуманизированные, биспецифичные или мультиспецифичные антитела.

Как применено в настоящем документе, антитело или иммуноглобулин также включает "однодоменные антитела", которые были описаны совсем недавно и которые представляют собой антитела, чьи определяющие комплементарность области представляют собой часть однодоменного полипептида. Примеры однодоменных антител включают антитела, содержащие только тяжёлую цепь, антитела естественно лишенные легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных четырехцепочечных антител, генно-инженерные однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены из любого вида, включая без ограничений, мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика и быка. Однодоменные антитела могут представлять собой природные однодоменные антитела, известные как антитела, содержащие только тяжёлую цепь, лишенные легких цепей. В особенности, виды Camelidae, например, верблюд, дромадер, лама, альпака и гуанако, продуцируют антитело, содержащее только тяжёлую цепь, естественно лишенное легкой цепи. В антителах верблюдовых, содержащих только тяжёлую цепь, также отсутствует домен CH1.

Вариабельная область тяжелой цепи данных однодоменных антител, лишенных легких цепей, известна в данной области техники как "VHH" или "наноантитело". Подобно обычным доменам VH, VHH содержат четыре FR и три CDR. Наноантитела имеют преимущества перед обычными антителами: они примерно в десять раз меньше, чем молекулы IgG, и, как следствие, правильно уложенные функциональные наноантитела могут быть получены путем экспрессии in vitro с достижением высокого выхода. Кроме того, наноантитела очень стабильны и устойчивы к действию протеаз. Свойства и получение наноантител были рассмотрены в работе Harmsen and De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:13-22.

Термин "моноклональное антитело" или "mAb", как применен в настоящем документе, относится к молекуле антитела единого аминокислотного состава, которое направлено против определенного антигена, и не должен быть истолкован как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональное антитело может продуцироваться одним клоном B-клеток или гибридомой, но также может представлять собой рекомбинантное антитело, т.е. полученное с помощью белковой инженерии.

"Фрагменты" (обычного) антитела включают часть интактного антитела, в особенности антигенсвязывающую область или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', dsFv, $(dsFv)_2$, scFv, $sc(Fv)_2$, диатела, биспецифичные и мультиспецифичные антитела, сформированный из фрагментов антитела. Фрагмент обычного антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело, состоящее только из тяжёлых цепей, или VHH.

Термин "Fab" обозначает фрагмент антитела, с молекулярной массой около 50000 Да и антигенсвязывающей активностью, при которой около половины N-концевой стороны H-цепи и вся L-цепь, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазой папаином, связаны друг с другом через дисульфидную связь.

Термин "$F(ab')_2$" относится к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу около 100000 Да и антигенсвязывающую активность, которая немного больше, чем у Fab, связанного через дисульфидную связь шарнирной области, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазой пепсином.

Одноцепочечный полипептид Fv ("scFv") представляет собой ковалентно связанный гетеродимер VH::VL, который обычно экспрессируется в результате слияния генов, включая VH- и VL-кодирующие гены, связанные пептидкодирующим линкером. Фрагмент scFv человека согласно изобретению включает CDR, которые поддерживают в соответствующей конформации, в особенности, с применением способов генной рекомбинации. Двухвалентные и многовалентные фрагменты антитела могут образовываться спонтанно при ассоциации одновалентных scFvs, или могут быть получены путем связывания одновалентных scFv с помощью пептидного линкера, такого как двухвалентный $sc(Fv)_2$.

"dsFv" представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный дисульфидной связью. "$(dsFv)_2$" обозначает два dsFv, связанных пептидным линкером.

Термин "биспецифичное антитело" или "BsAb" обозначает антитело, которое объединяет антигенсвязывающие сайты двух антител в одной молекуле. Таким образом, BsAbs способны связывать два разных антигена одновременно. Генная инженерия все чаще применяется для разработки, модификации и производства антител или производных антитела с желаемым набором свойств по связыванию и эффекторным функциям, как описано, например, в EP 2050764 A1.

Термин "мультиспецифическое антитело" обозначает антитело, которое объединяет антигенсвязывающие сайты двух или более антител в одной молекуле.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, эти фрагменты включают вариабельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При применении такого линкера, который слишком короток, чтобы разрешить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи,

домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

В конкретном воплощении эпитопсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', dsFv, $(dsFv)_2$, scFv, $sc(Fv)_2$, диател и VHH.

"Химерное антитело", как применено в настоящем документе, представляет собой антитело, в котором константная область, или ее часть, изменена, заменена или обменена так, что вариабельная область связана с константной областью другого вида или принадлежит другому классу или подклассу антител. "Химерное антитело" также относится к антителу, в котором вариабельная область или ее часть изменена, заменена или обменена так, что константная область связана с вариабельной областью другого вида или принадлежит к другому классу или подкласс антител.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, которое изначально полностью или частично имеет происхождение не от человека и которое было модифицировано для замены определенных аминокислот, в частности в каркасных областях тяжелых и легких цепей, чтобы избежать или минимизировать иммунный ответ у людей. Константные домены гуманизированного антитела в большинстве случаев представляют собой домены CH и CL человека. В воплощении гуманизированное антитело имеет константные домены человеческого происхождения. Как применено в настоящем документе, термин "гуманизированное антитело" относится к химерному антителу, которое содержит минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, происходящего не от человека, например CDR.

Термин "антитело" применяют, чтобы охватить все эти виды антител, фрагментов или их комбинации.

Цель гуманизации заключается в снижении иммуногенности ксеногенного антитела, такого как мышиное антитело, для введения в организм человека при сохранении полной антигенсвязывающей аффинности и специфичности антитела. Гуманизированные антитела, или антитела, адаптированные для невосприимчивости другими млекопитающими, могут быть получены с применением нескольких технологий, таких как изменение поверхности и пересадка CDR. Как применено в настоящем документе, в технологии изменения поверхности применяют комбинацию молекулярного моделирования, статистического анализа и мутагенеза для изменения поверхности, не относящейся к CDR вариабельных областей так, чтобы они напоминали поверхности известного антитела целевого хозяина.

Антитела могут быть гуманизированы с помощью множества других способов, включая пересадку CDR (EP 0239400; WO 91/09967; патенты США № 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (EP 0592106; EP 0519596; Padlan (1991) Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 91:969-973) и перестановку цепей (патент США № 5565332). Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея. Смотрите также патенты США № 4444887, 4716111, 5545806, и 5814318; и Международные патентные заявки WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В контексте изобретения термин "проводить лечение" или "лечение", как применен в настоящем документе, означает изменение, облегчение, торможение развития или предотвращение расстройства или состояния, к которому применяется такой термин, или одного или нескольких симптомов такого расстройства или состояния.

Под термином "проводить лечение рака", как применен в настоящем документе, в особенности, подразумевают ингибирование роста злокачественных клеток опухоли и/или прогрессирования метастазов из указанной опухоли. Такое лечение также может привести к регрессии опухолевого роста, т.е. к уменьшению размеров измеримой опухоли. В конкретном воплощении такое лечение приводит к частичной регрессии опухоли или метастазирования. В другом конкретном воплощении такое лечение приводит к полной регрессии опухоли или метастазирования. В некотором аспекте лечение предотвращает метастазирование.

В соответствии с изобретением термин "пациент" или "нуждающийся в этом пациент" предназначен для человека или млекопитающего, не представляющего собой человека, пораженного или вероятно пораженного злокачественной опухолью.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается достаточное количество активных агентов для лечения указанного ракового заболевания при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Понятно, однако, что общее количество для ежедневного применения активных агентов будет определять лечащий врач в рамках обоснованного врачебного решения. Конкретный терапевтически эффективный уровень для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и степень тяжести расстройства; активность конкретного применяемого полипептида или антитела; конкретный применяемый состав, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость выведения конкретных применяемых активных агентов; продолжительность лечения; лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с конкретными применяемыми активными веществами; и тому подобные факторы, хорошо известные в медицине.

"Фармацевтически" или "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным веществам и

композициям, которые не вызывают побочных действий, аллергических и других нежелательных реакций при введении млекопитающему, в особенности, человеку, в зависимости от обстоятельств. Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель относится к нетоксичному твердому, мягкому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательной композиции любого типа.

Фармацевтические композиции

Форма фармацевтических композиций, включая полипептид или антитело согласно изобретению и путь введения, естественно, зависит от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, веса или пола пациента и т.д.

Активные агенты согласно изобретению могут быть приготовлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и им подобных типов введения. В конкретном воплощении активные агенты согласно изобретению вводят внутривенно.

В особенности, фармацевтические композиции, включающие активные агенты, согласно изобретению могут содержать носители, которые фармацевтически приемлемы для композиции, которую можно вводить с помощью инъекции. Они могут, в особенности, представлять собой изотонические, стерильные, солевые растворы (мононатрий или динатрий фосфат, натрия, калия, кальция или магния хлорид и им подобного или смеси таких солей), или сухие, в особенности, лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического солевого раствора, позволяют составлять растворы для инъекций.

Для получения фармацевтических композиций эффективное количество активных агентов согласно изобретению может быть растворено или диспергировано в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, пригодные для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать путем применения покрытия, такого как лецитин, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ, стабилизирующих средств, криопротекторов и антиоксидантов. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено антибактериальными и противогрибковыми средствами. Во многих случаях будет предпочтительным включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активных ингредиентов в необходимом количестве в соответствующем растворителе вместе с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительные способы приготовления представляют собой технологию вакуумной сушки и лиофильной сушки, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

После приготовления растворы будут вводить способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое представляет собой терапевтически эффективное количество. Композиции легко вводят в различных лекарственных формах, таких как описанные выше типы растворов для инъекций, но также могут быть применены капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

Для парентерального введения в водном растворе, например, при необходимости раствор должен быть соответствующим образом забуферен, а жидкий разбавитель исходно делают изотоническим с достаточным количеством физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы, в особенности, подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, стерильные водные среды, которые могут быть применены, известны специалистами в данной области техники в свете настоящего раскрытия. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и добавлена к 1000 мл жидкость для подкожных инъекций или введена в предлагаемом месте инфузии (смотри, например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение в дозировке обязательно произойдет в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определит подходящую дозу для индивидуального субъекта.

Введение лекарственных средств и способ применения

Как применено в настоящем документе, термин "одновременно" применяют для обозначения того, что два средства вводят одновременно, тогда как термин "в комбинации" применяют для обозначения того, что их вводят, если не одновременно, то "последовательно" в течение периода времени, когда они оба могут действовать терапевтически в течение одних и тех же временных рамок. Таким образом, введение "последовательно" может позволить вводить один агент в течение 5, 10 мин или нескольких часов после другого, при условии, что период полураспада в кровотоке первого введенного агента таков, что они оба одновременно присутствуют в терапевтически эффективных количествах. Временная задержка между введением компонентов будет варьировать в зависимости от точной природы компонентов, взаимодействия между ними и их соответствующих периодов полураспада.

В отличие от "в комбинации" или "последовательно" термин "раздельно" применяют здесь, чтобы обозначить, что разрыв между введением одного агента и другого значителен, т.е. несколько часов, и это может включать случай, когда первый введенный агент больше не присутствует в кровотоке в терапевтически эффективном количестве, когда вводится второй агент.

В воплощении изобретения нейтрализующий агент NTN1 или антитело против нетрина-1 вводят последовательно или раздельно перед ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

В особенно предпочтительном воплощении ингибитор контрольной точки иммунного ответа последовательно или раздельно перед нейтрализующим агентом NTN1 или антителом против нетрина-1.

В воплощении как нейтрализующий агент NTN1, так и антитело против нетрина-1, как обеспечены в настоящем документе, и ингибитор контрольной точки иммунного ответа находятся в одной композиции с фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем и/или разбавителем.

В другом воплощении они представлены в виде отдельных фармацевтических форм или составного комплекта. Это формирует композицию или набор или составной комплект, включающий нейтрализующий агент NTN1 или антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, для одновременного, раздельного или последовательного введения пациенту. Таким образом, изобретение может включать (i) композицию, включающую два активных ингредиента в виде смеси, или (ii) композицию, включающую данные активные ингредиенты, которые хранят раздельно в одних и тех же условиях или в отдельных условиях, и один из них обычно относится к понятию набора частей в случае (ii).

В воплощении способа лечения, применения и композиций для применения, применяют последовательное или раздельное введение. Интервал между двумя введениями может составлять, по меньшей мере, 5, 10, 15, 20 или 24 ч, предпочтительно, от 24 до 96 ч, более предпочтительно от 24 до 72 ч или более, в особенности от 24 до 48 ч, например 24 ч. В воплощении один агент или лекарственное средство просто вводят на следующий день после введения другого агента или лекарственного средства.

Различные фармацевтические формы могут быть применены в способах лечения, в достаточных количествах.

Изобретение не подразумевает или не может подразумевать изменение режима дозирования ингибитора контрольной точки иммунного ответа. Тем не менее, синергия, которая имеет место с нейтрализующим агентом NTN1 или антителом против нетрина-1 может позволить применять сниженный режим дозирования ингибитора контрольной точки иммунного ответа у пациента. Специалист в данной области техники способен определить оптимальный режим дозирования в контексте комбинированного лечения, обеспечиваемого настоящим изобретением.

Фармацевтические композиции могут быть введены субъекту в подходящей дозе, т.е. для нейтрализующего агента NTN1 или антитела против нетрина-1, по меньше мере, 1 мг/кг массы тела, например, примерно от 1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела, в особенности, примерно от 10 мг/кг массы тела до примерно 60 мг/кг массы тела субъекта, у которого рак подлежит лечению. Ингибитор контрольной точки иммунного ответа можно вводить в обычной дозе, или в уменьшенной дозе по сравнению с обычной дозой, так как комбинация обладает синергической эффективностью. Например, дозу ингибитора контрольной точки иммунного ответа снижают на 10, 20, 30, 40, 50% или более.

Как применено в настоящем документе, термин "синергический" означает, что активные компоненты, например антитела, производят больший эффект при применении в комбинации, чем можно было бы ожидать от сложения отдельных эффектов двух компонентов. Преимущественно, синергическое взаимодействие может позволить вводить пациенту сниженные дозы каждого компонента, тем самым уменьшая токсичность химиотерапии, в то же время, производя и поддерживая тот же терапевтический эффект. Таким образом, в особенно предпочтительном воплощении каждый компонент можно вводить в субтерапевтическом количестве.

Таблица 2. Описание последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Аминокислотная (aa) последовательность (seq.) NTN1 с сигнальным пептидом, выделенным жирным шрифтом, и линейное картирование эпитопа выделено жирным шрифтом и подчеркнуто	***MMRAVWEALAALAAVACLVGAVRG***GPGLSMFAGQAAQPD PCSDENGHPRRCIPDFVNAAFGKDVRVSSTCGRPPARYCVV SERGEERLRSCHLCNASDPKKAHPPAFLTDLNNPHNLTCW QSENYLQFPHNVTLTLSLGKKFEVTYVSLQFCSPRPESMAI YKSMDYGRTWVPFQFYSTQCRKMYNRPHRAPITKQNEQE AVCTDSHTDMRPLSGGLIAFSTLDGRPSAHDFDNSPVLQD WVTATDIRVAFSRLHTFGDENEDDSELARDSYFYAVSDLQ VGGRCKCNGHAARCVRDRDDSLVCDCRHNTAGPECDRCK PFHYDRPWQRATAREANEC**VACNCNLHARRCRFNMELY KLSGRKSGGVCLNCRHNTAGRHCH**YCKEGYYRDMGKPI THRKACKACDCHPVGAAGKTCNQTTGQCPCKDGVTGITC NRCAKGYQQSRSPIAPCIKIPVAPPTTAASSVEEPEDCDSYC KASKGKLKINMKKYCKKDYAVQIHILKADKAGDWWKFTV NIISVYKQGTSRIRRGDQSLWIRSRDIACKCPKIKPLKKYLLL GNAEDSPDQSGIVADKSSLVIQWRDTWARRLRKFQQREKK
		GKCKKA
2	Нуклеотидная seq. NTN1	ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCTGGC GGCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGCGGTGCGCGGCGGGC CCGGGCTCAGCATGTTCGCGGGCCAGGCGGCGCAGCCCG ATCCCTGCTCGGACGAGAACGGCCACCCGCGCCGCTGCA TCCCGGACTTTGTCAATGCGGCCTTCGGCAAGGACGTGC GCGTGTCCAGCACCTGCGGCCGGCCCCCGGCGCGCTACT GCGTGGTGAGCGAGCGCGGCGAGGAGCGGCTGCGCTCG TGCCACCTCTGCAACGCGTCCGACCCCAAGAAGGCGCAC CCGCCCGCCTTCCTCACCGACCTCAACAACCCGCACAAC CTGACGTGCTGGCAGTCCGAGAACTACCTGCAGTTCCCG CACAACGTCACGCTCACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTC GAAGTGACCTACGTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGG CCCGAGTCCATGGCCATCTACAAGTCCATGGACTACGGG CGCACGTGGGTGCCCTTCCAGTTCTACTCCACGCAGTGC CGCAAGATGTACAACCGGCCGCACCGCGCGCCCATCACC AAGCAGAACGAGCAGGAGGCCGTGTGCACCGACTCGCA CACCGACATGCGCCCGCTCTCGGGCGGCCTCATCGCCTT CAGCACGCTGGACGGGCGGCCCTCGGCGCACGACTTCGA CAACTCGCCCGTGCTGCAGGACTGGGTCACGGCCACAGA CATCCGCGTGGCCTTCAGCCGCCTGCACACGTTCGGCGA CGAGAACGAGGACGACTCGGAGCTGGCGCGCGACTCGT ACTTCTACGCGGTGTCCGACCTGCAGGTGGGCGGCCGGT GCAAGTGCAACGGCCACGCGGCCCGCTGCGTGCGCGAC CGCGACGACAGCCTGGTGTGCGACTGCAGGCACAACAC GGCCGGCCCCGGAGTGCGACCGCTGCAAGCCCTTCCACTA CGACCGGCCCTGGCAGCGCGCCACAGCCCGCGAAGCCA ACGAGTGCGTGGCCTGTAACTGCAACCTGCATGCCCGGC GCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGC GCAAGAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTCGCCACAACA CCGCCGGCCGCCACTGCCATTACTGCAAGGAGGGCTACT ACCGCGACATGGGCAAGCCCATCACCCACCGGAAGGCC TGCAAAGCCTGTGATTGCCACCCTGTGGGTGCTGCTGGC AAAACCTGCAACCAAACCACCGGCCAGTGTCCCTGCAAG GACGGCGTGACGGGTATCACCTGCAACCGCTGCGCCAAA GGCTACCAGCAGAGCCGCTCTCCCATCGCCCCCTGCATA AAGATCCCTGTAGCGCCGCCGACGACTGCAGCCAGCAGC GTGGAGGAGCCTGAAGACTGCGATTCCTACTGCAAGGCC TCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAACATGAAAAAGTACTG CAAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAAGGC GGACAAGGCGGGGGACTGGTGGAAGTTCACGGTGAACA TCATCTCCGTGTATAAGCAGGGCACGAGCCGCATCCGCC GCGGTGACCAGAGCCTGTGGATCCGCTCGCGGGACATCG CCTGCAAGTGTCCCAAAATCAAGCCCCTCAAGAAGTACC TGCTGCTGGGCAACGCGGAGGACTCTCCGGACCAGAGC GGCATCGTGGCCGATAAAAGCAGCCTGGTGATCCAGTGG CGGGACACGTGGGCGCGGCGGCTGCGCAAGTTCCAGCA GCGTGAGAAGAAGGGCAAGTGCAAGAAGGCCTAGCG
3	Эпитопная aa seq. NTN1	VACNCNLHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTAG RHCH
4	Эпитопная кДНК seq. NTN1	GTGGCCTGTAACTGCAACCTGCATGCCCGGCGCTGCCGC TTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAAGAGC GGAGGTGTCTGCCTCAACTGTCGCCACAACACCGCCGGC CGCCACTGCCAT
5	aa seq. для CDR1-H (IMGT)	GYTFTSYN
6	aa seq. для CDR2-H	IYPGNGDT

	(IMGT)	
7	aa seq. для CDR3-H (IMGT)	ARGGTGFAY
8	aa seq. для CDR1-L (IMGT)	QSVSND
-	aa seq. для CDR2-L (IMGT)	YAS
9	aa seq. для CDR3-L (IMGT и Кабат)	QQDYSSPWT
10	последовательность 4C11 VH мыши	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS**GYTFTSYN**MHWVK QTPRQGLEWIGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYFC**ARGGTGFAY**WGQGTLVTVSA
11	последовательность 4C11 VL мыши	SI**V**MTQTPKFLLVSAGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYQQKP GQSPKLLIY**YAS**NRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAE DLAVYFC**QQDYSSPW**TFGGGTKLEIK
12	Полная последовательность 4C11 (VH + CH IgG1) мыши	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS**GYTFTSYN**MHWVK QTPRQGLEWIGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYFC**ARGGTGFAY**WGQGTLVTVSAA KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCN VAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK DVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT QPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPA PIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDF FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNV QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
13	Полная последовательность 4C11 (VL + Каппа CL мыши)	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYQQKP GQSPKLLIY**YAS**NRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAE DLAVYFC**QQDYSSPW**TFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRNEC
14	Последовательность VL гуманизированного варианта 4C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKAS**QSVSND**VAWYQQKP GKAPKLLIY**YAS**NRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDA AYYFC**QQDYSSPW**TFGQG
15	Последовательность VL гуманизированного варианта 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWFQQRPG QSPRRLIY**YAS**NRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDA ATYYC**QQDYSSPW**TFGQG
16	Последовательность VL гуманизированного варианта 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYQQKP GQAPRLLIY**YAS**NRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDA AYYFC**QQDYSSPW**TFGQG
17	Последовательность VL гуманизированного варианта 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYLQKP GQSPQLLIY**YAS**NRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAED AATYYC**QQDYSSPW**TFGQG
18	Последовательность VL гуманизированного варианта 4C11	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKAS**QSVSND**VAWYQQKPG QAPRLLIY**YAS**NRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAA YYFC**QQDYSSPW**TFGQG
19	Последовательность VL гуманизированного варианта 4C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**QSVSND**VAWYQQKP GQAPRLLIY**YAS**NRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDF AVYYC**QQDYSSPW**TFGQG
20	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYN**MHWVR QATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTI**T**ADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
21	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GYTFTSYN**MHWIRQPP GKGLEWIGA**IYPGNGD**TSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG

22	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GYTFTSYN**MHWVRQA TGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRLTISKDTSKNQV VLTMTNMDPVDTATYYC**ARGGTGFAY**WGQG
23	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS**GYTFTSYN**MHWVRQ ATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRFTISRDDSKNT AYLQMNSLKTEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
24	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GYTFTSYN**MHWVRQ APGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
25	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYN**MHWVR QATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
26	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GYTFTSYN**MHWVRQA TGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
27	Последовательность VH гуманизированного варианта 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYN**MHWVR QAPGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYAQKFKGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQ
28	aa seq. для CDR1-H (Кабат)	SYNMH
29	aa seq. для CDR2-H (Кабат)	AIYPGNGDTSYNQKFKG
30	aa seq. для CDR3-H (Кабат)	GGTGFAY
31	aa seq. для CDR1-L (Кабат)	KASQSVSNDVA
32	aa seq. для CDR2-L (Кабат)	YASNRYT
33	Прямой праймер	aaaagtactgcaagaaggactatgc
34	Обратный праймер	ccctgcttatacacggagatg
35	Эпитопная aa seq. NTN1	ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC
36	Эпитопная кДНК seq. NTN1	GCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTT TCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGC

Где это необходимо в табл. 1, CDR по IMGT выделены жирным шрифтом.

Теперь изобретение будут описано с применением неограничивающих примеров с отсылками к фигурам.

Фиг. 1: Мышам трансплантировали клетки молочных желез линии EMT-6 и их обработали лекарственным средством, препятствующим действию анти-нетрина-1 (HUM03); с контрольным антителом (NP006); с HUM03 + анти-CTLA-4 или NP006 + анти-CTLA-4 (n=12 животных/группа). Объем опухоли измеряли наружно, а общую регрессию объема опухоли определяли количественно через 28 дней после имплантации. В таблице показано количество мышей без опухоли через 28 дней.

Фиг. 2: То же что фиг. 1, но фигура показывает процент выживаемости мышей, количественно определяемый после анализа Каплана-Майера вплоть до 80-го дня после имплантации опухоли молочной железы EMT-6 (P=0,046).

Фиг. 3: Тот же эксперимент, что и на фиг. 1 и 2, но показан рост опухоли для каждого животного. Умерщвление животного обозначено как ✝.

Фиг. 4: Тот же эксперимент, что и на фиг. 1-2-3, но мышам прививали клетки линии рака молочной железы 4T1, и их обрабатывали HUM03 + анти-PD-1 или NP001 + анти-PD-1 (n=7 животных/группа). Выживаемость мышей определяли количественно с помощью анализа Каплана-Майера на 25 день (p=0,0411).

Фиг. 5: Комбинация HUM03 с анти-CTLA4 модулирует баланс эффектор Т-клеток опухоли/Treg в модели сингенных мышей с ксенотрансплантатом EMT6. 10^6 клеток EMT6 подкожно трансплантировали в бок 8-недельных самок мышей BalbCJ. Животные были случайным образом разделены на 4 группы, получавшие 3 раза (например, на 10, 14, 18 день) HUM03 (10 мг/кг IP) или контрольный изотип NP001 IgG1, раздельно или в сочетании с анти-CTLA4 (BioXcell - клон 9H10-20 мг/кг I.P.). Опухоли EMT6 индивидуально разрушали и анализировали проточной цитометрией с исчерпывающими лимфоидными и миелоидными окрашивающими панелями. Здесь мы сфокусируемся на эффекторе CD8 Т-клеток (слева), CD4; FoxP3 TReg (посередине) и балансе между ними (справа). Как видно на правой панели, в комбинации HUM03/CTLA4 mAb баланс эффектор Т-клеток/Т-регулятор сдвигается в сторону эффектора Т-клеток.

Пример 1.

Материалы и способы

Клеточные линии

Клетки мышиной карциномы молочной железы EMT6 (ATCC® CRL2755™ -стандарты LGC - Франция) культивировали в минимальной необходимой среде Игла с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков (стрептомицин и пенициллин).

Клетки молочной железы Mus Musculus 4T1 (ATCC® CRL-2539™ - стандарты LGC - Франция) культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), 10% FBS.

Эксперименты на мышах

Мышей содержали в специальном, свободном от болезнетворных микроорганизмов виварии и с ними обращались в соответствии с установленными руководящими принципами и протоколами, утвер-

жденными комитетом по уходу за животными (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4; CECCAP).

5×10^5 или 10×10^5 клеток EMT6 трансплантировали подкожно на боку 8-недельных самок-мышей BalbC/J. Всех животных обрабатывали анти-CTLA4, 3 раза по 400 мкг на инъекцию (BioXcell США - клон 9H10-) на 7, 11 и 14 день. Животных случайным образом разделяли на 4 группы, которые обрабатывали HUM03; NP006, контрольным изотипом IgG1 (Нетрис Фарма, Франция); HUM03 + анти-CTLA4 и NP001 + анти-CTLA-4, соответственно. Антитела NP006 и HUM03 вводили внутрибрюшинно трижды в неделю в дозе 10 мг/кг. Опухоль измеряли два раза в неделю с помощью наружных калиперов. Прогрессирование опухоли определяли через 29 дней после трансплантации. Когда объем опухолей достигал 2000 мм^3, мышей умерщвляли и определяли выживаемость.

5×10^5 клеток 4T1 подкожно трансплантировали на боку BalbC/J у 7-недельных самок мышей. Животных обрабатывали в течение двух недель по 100 мкг на инъекцию анти-PD1 антитела в соответствующих группах (BioXcell США - клон RMP1-14). Животные были случайным образом разделены на 3 группы, получавшие PBS; HUM03 + анти-PD-1 и NP001 (Нетрис Фарма, Франция) + анти-PD1, соответственно. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью наружных калиперов. Когда объем опухолей достигал 1500 мм^3, мышей умерщвляли и определяли выживаемость.

Статистика

Статистические данные были получены с применением программного обеспечения GraphPad, T-критерий Стьюдента был двусторонним, а значение P, менее 0,05, считали статистически значимым.

Кривые выживания получали способом Каплана-Мейера в программном обеспечении GraphPad. Данные анализировали с помощью теста Мантеля-Кокса. n означает число повторов. Все статистические тесты были двусторонними, и значение P менее 0,05 считали статистически значимым.

Результаты/обсуждение

1) Комбинирование mAb HUM03 и CTLA4 задерживает рецидив опухоли и увеличивает выживаемость мышей в модели рака молочной железы EMT6.

Для проверки комбинации анти-Нетрин-1 mAb и анти-CTLA4 раковые клетки молочной железы EMT-6 прививали мышам BalbC/J.

Как показано на фиг. 1-3, объединение HUM03 с ингибитором контрольной точки иммунного ответа CTLA4 в значительной степени усиливает противоопухолевый ответ, наблюдаемый только с CTLA4. Число мышей без опухоли на 28-ой день лечения изменяется от 0/12 в группе, получавшей только HUM03, и 2/12 в группе, получавшей только CTLA4, до 8/12 при комбинированной терапии (фиг. 1). Выживаемость мышей также количественно определяли после анализа способом Каплана-Майера в течение 80-ти дней (p=0,046), и это показывает, что комбинация увеличила выживаемость (фиг. 2) и это, по-видимому, связано с более длительным контролем заболевания с помощью комбинированной терапии (фиг. 3). Чтобы проанализировать, может ли эта повышенная активность комбинации ограничиваться CTLA4 или может быть распространена на другой ингибитор контрольной точки иммунного ответа, на следующем этапе мы проанализировали эффект комбинации HUM03 с PD-1.

2) Комбинирование mAb HUM03 и PD-1 увеличивает выживаемость мышей в модели рака молочной железы 4T1.

Для тестирования комбинации анти-нетрин-1 mAb и анти-PD1 раковые клетки молочной железы 4T1 прививали мышам BalbC/J. Как показано на фиг. 4, выживаемость мышей определяли количественно после анализа Каплана Майера через 20 дней после трансплантации (p=0,0411) (фиг. 4). Подобно тому, что наблюдали с CTLA4, комбинация PD-1/HUM03 была более эффективна, чем один PD-1. Действительно, хотя при монотерапии одним PDA mAb отсутствует увеличение выживаемости (4 из 7 мышей были живы на 20-й день аналогично тому, что наблюдали в контрольной группе обработки), комбинирование HUM03 с PD1 увеличивает выживаемость мышей до 100% (7 из 7 мышей были живы на день 20).

Вместе эти данные подтверждают мнение, что объединение HUM03 с современными иммунотерапевтическими средствами повышает их эффективность. В поисках механизма, который мог бы объяснить этот усиленный эффект ингибитора контрольной точки иммунного ответа при наличии вмешательства нетрина-1, мы проанализировали опухолевый иммунный инфильтрат, полученный в ответ на монотерапию или комбинированное лечение.

3) Комбинирование HUM03 и CTLA4 mAb способствует установлению в опухоли соотношения эффекторы Т-клеток/Т-регуляторы в модели рака молочной железы EMT6.

Чтобы проанализировать эффект комбинации анти-нетрин-1 mAb и анти-CTLA4 в опухолевом иммунном инфильтрате, раковые клетки молочной железы EMT-6 прививали мышам BalbC/J, как описано выше, и их обрабатывали либо одним HUM03 (по сравнению с контрольным изотипом NP001), одним CTLA4 или комбинацией HUM03 + CTLA4 mAb. Опухоли разрушали и лимфоидные клетки анализировали проточной цитометрией. Как показано на фиг. 5, хотя монотерапия (либо HUM03, либо CTLA4) не оказывает существенного влияния на отношение эффектор Т-клеток/регулятор Т-клеток, комбинация сдвигает это отношение в сторону эффектора Т-клеток. Это подтверждает повышенную эффективность, предполагая, что комбинация усиливает присутствие лимфоидных клеток-киллеров (эффектор Т-клеток).

Пример 2.

5×10^5 клеток EO771 подкожно трансплантировали на боку 8-недельных самок мышей C57b6J. Через 6 дней после трансплантации животных случайным образом разделяли на 4 группы, которым вводили NP137 или контрольный изотип NP001 IgG1 по отдельности или в комбинации с анти-PD-1 антителом. Всем животным дважды в неделю вводили внутрибрюшинно анти-CTLA4 (BioXcell - клон 9H10) в дозе 20 мг/кг и/или NP антитела в дозе 10 мг/кг. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю с помощью внешних измерителей. Когда объем опухолей достигал 2000 $мм^3$, мышей умерщвляли.

5×10^5 клеток MC38 подкожно трансплантировали на боку 8-недельных самок мышей C57b6J. Через 6 дней после трансплантации животных случайным образом разделяли на 4 группы, которым вводили NP137 или контрольный изотип NP001 IgG1 по отдельности или в комбинации с анти-PD-1 антителом. Всех животных обрабатывали два раза в неделю по IP-пути анти-PD-1 (BioXcell - клон RMP1-14) в дозе 5 мг/кг и/или NP антителами в дозе 10 мг/кг. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю с помощью внешних измерителей. Когда опухоли достигли объема 2000 $мм^3$, мышей умерщвляли.

5×10^6 клеток 0016eM3 подкожно трансплантировали на боку 8-недельных самок мышей C57b6J. Через 6 дней после трансплантации животных случайным образом разделяли на 4 группы, которым вводили только NP137 или контрольный изотип NP001 IgG1 по отдельности или в комбинации с анти-PD-1 антителом. Всех животных обрабатывали два раза в неделю анти-PD-1 по IP-пути (BioXcell - клон RMP1-14) в дозе 5 мг/кг и/или NP антителами в дозе 10 мг/кг. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю с помощью внешних измерителей. Когда опухоли достигли объема 2000 $мм^3$, мышей умерщвляли.

Клетки EMT-6 и 4T1 (см. пример 1) также применяли в аналогичных условиях.

Следующая таблица демонстрирует потенцирование или синергизм, возникающий в результате комбинации NP137 и анти-PD1 антитела.

Клеточная линия	Орган	Примененные ICI	Ответ		
			NP137	ICI	ICI + NP137
EMT-6	Рак молочной железы	CTLA-4	-	++	+++
EO771	Рак молочной железы	CTLA-4	-	+++	++++
4T1	Рак молочной железы	PD1	-	-	+
0016eM3	Меланома	PD1	-	+++	++++
MC38	Рак толстой кишки	PD1	-	+	++

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, включающая антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, в которой антитело против нетрина-1 специфически связывает полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35 и способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора, в которой ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело, блокирующее или ингибирующее PD1/PD-L1 и/или путь PD1/PD-L1, или антитело против CTLA-4.

2. Композиция по п.1, в которой подлежащий лечению рак представляет собой рак с экспрессией нетрина-1 и который может не отвечать только на ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

3. Композиция по п.1 или 2, в которой ингибитор контрольной точки иммунного ответа выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 и анти-CTLA-4 антитела.

4. Композиция по пп.1-3 для одновременного, раздельного или последовательного введения пациенту антитела против нетрина-1 и ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

5. Композиция по п.1, в которой антитело против нетрина-1 включает (i) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7 и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9 или (ii) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30 и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9.

6. Композиция по п.1, в которой антитело против нетрина-1 выбирают из группы, состоящей из антител против нетрина-1, включающих пару аминокислотных последовательностей VH и VL SEQ ID NO: 20 и 14, SEQ ID NO: 21 и 15, SEQ ID NO: 22 и 16, SEQ ID NO: 23 и 17, SEQ ID NO: 24 и 17, SEQ ID NO: 25 и 16, SEQ ID NO: 26 и 17, SEQ ID NO: 22 и 17, SEQ ID NO: 25 и 18, SEQ ID NO: 21 и 16 или SEQ ID NO: 27 и 19.

7. Композиция по п.5, в которой антитело против нетрина-1 включает пары VH и VL с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 22 и 16.

8. Композиция по любому из пп.5-7, в которой антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа представляют собой отдельные антитела для одновременного, раздельного или последовательного введения пациенту антитела против нетрина-1 и ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

9. Композиция по любому из пп.5-7 в качестве лекарственного средства.

10. Применение композиции по любому из пп.5-9 для лечения рака.

11. Применение по п.10, для одновременного, раздельного или последовательного введения пациенту антитела против нетрина-1 и ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

12. Фармацевтическая композиция, включающая антитело против нетрина-1 и ингибитор контрольной точки иммунного ответа, в которой антитело против нетрина-1 включает (i) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7 и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9 или (ii) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30, и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9; и ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело, блокирующее или ингибирующее PD1/PD-L1 и/или путь PD1/PD-L1, или антитело против CTLA-4.

13. Способ противоракового лечения, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против нетрина-1, специфически связывающего полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35, и ингибитора контрольной точки иммунного ответа, который представляет собой антитело, блокирующее или ингибирующее PD1/PD-L1 и/или путь PD1/PD-L1, или антитело против CTLA-4, в котором антитело против нетрина-1 способно нарушать или препятствовать взаимодействию нетрин-1/рецепторы нетрина-1 или опосредованной нетрином-1 димеризации рецептора.

14. Способ по п.13, в котором ингибитор иммунной контрольной точки выбирают из группы, состоящей из анти-PD1 и анти-CTLA-4 антител.

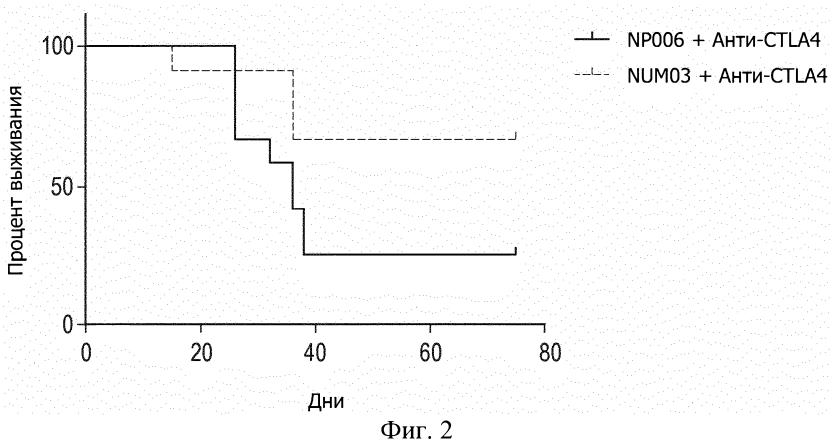
15. Способ по п.13 или 14, в котором антитело против нетрина-1 включает (i) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 7 и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2-L с последовательностью YAS и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9 или (ii) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 28, CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 30, и CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2-L с последовательностью SEQ ID NO: 32 и CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 9.

16. Способ по п.15, в котором антитело против нетрина-1 выбирают из группы, состоящей из антител против нетрина-1, включающих пару аминокислотных последовательностей VH и VL SEQ ID NO: 20 и 14, SEQ ID NO: 21 и 15, SEQ ID NO: 22 и 16, SEQ ID NO: 23 и 17, SEQ ID NO: 24 и 17, SEQ ID NO: 25 и 16, SEQ ID NO: 26 и 17, SEQ ID NO: 22 и 17, SEQ ID NO: 25 и 18, SEQ ID NO: 21 и 16 или SEQ ID NO: 27 и 19.

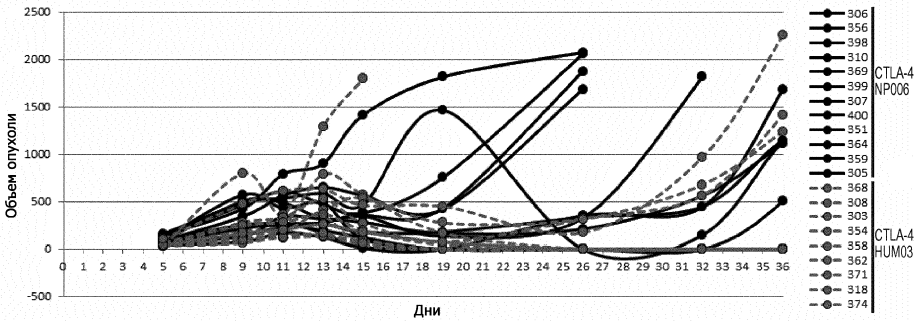
17. Способ по п.15, в котором антитело против нетрина-1 включает пары VH и VL с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 22 и 16.

NP006	HUM03	Анти-CTLA4 + NP006	Анти-CTLA4 + NUM03
0/12	0/12	2/12	8/12 p=0,0394 (критерий Кокса-Мантеля)

Фиг. 1



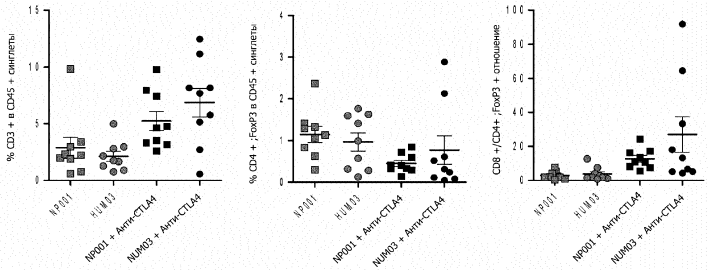
Фиг. 2



Фиг. 3

PBS	Анти-PD1 + NP006	Анти- PD1 + NUM03
4/7	4/7	7/7 p=0,0411 (критерий Кокса-Мантеля)

Фиг. 4



Фиг. 5