

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992575** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.13

(22) Дата подачи заявки
2018.04.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/763 (2015.01)

(54) БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА

(31) 62/491,746

(32) 2017.04.28

(33) US

(86) PCT/US2018/029915

(87) WO 2018/201028 2018.11.01

(71) Заявитель:
МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП.;
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Гансерт Дженифер Лоррейн,
Андерсон Абрахам Антонио, Горски
Кевин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Обеспечены биомаркеры, пригодные для идентификации различных видов рака, которые поддаются лечению комбинированной терапией, включающей пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент и талимоген лагерапарепвек. Обеспечены способы лечения злокачественных опухолей, резистентных к монотерапии пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом. Также обеспечены способы лечения рака у субъекта, имеющего опухоль с низкой плотностью CD8+, низкой или негативной сигнатурой интерферона гамма и/или низким или негативным статусом PD-L1.

A1

201992575

201992575

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–558675EA/032

БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА

Родственные заявки

[001] Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки США № 62/491746, поданной 28 апреля 2017 г. Содержание вышеуказанной заявки включено здесь посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Область техники, к которой относится изобретение

[002] Настоящее изобретение относится к области лечения рака. В частности, настоящее изобретение относится к биомаркерам, пригодным для идентификации различных видов рака, которые можно лечить комбинированной терапией, включающей пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент и талимоген лагерпарепвек.

Уровень техники

[003] Лечение анти-PD-1- или анти-PD-L1-антителами приводит к долгосрочным противоопухолевым ответам у пациентов с различными видами рака, и оно становится стандартом лечения пациентов с метастатической меланомой, карциномами головы и шеи, легкого, почек и мочевого пузыря, а также с карциномой Меркеля и болезнью Ходжкина (Sharma P. and Allison J.P. (2015) The future of immune checkpoint therapy. Science, 348, 56–61). Однако во всех этих показаниях только часть пациентов отвечает на терапию, при том, что большинство пациентов в основном резистентны к блокаде PD-1. Следовательно, необходимы новые способы лечения рака, направленные на резистентные к блокаде PD-1 злокачественные опухоли.

Сущность изобретения

[004] Настоящее изобретение основано на открытии биомаркеров (например, интратуморальных биомаркеров), которые можно использовать для идентификации опухоли, которая отвечает на комбинированную терапию пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом и талимогеном лагерпарепвек. Настоящее изобретение особенно пригодно для лечения опухолей у субъектов, которые ранее не подвергались лечению или получили недостаточный эффект лечения в монотерапии (т. е. ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапии или анти-PD-1 терапии (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагментом)). Было установлено, что интратуморальное введение онколитического вируса талимогена лагерпарепвека (вируса простого герпеса 1 типа, сконструированного для преимущественной репликации в опухолях и продукции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)) повышает интратуморальную инфильтрацию цитотоксическими Т-клетками у пациентов-людей, тем самым повышая противоопухолевую активность анти-PD-1-антитела, пембролизумаба, при использовании в виде комбинированной терапии у субъектов с опухолями, которые демонстрируют низкую плотность CD8⁺ Т-клеток,

низкую или негативную сигнатуру интерферона гамма, и/или низкий или негативный статус PD-L1, и/или у субъектов, которые не отвечали или слабо отвечали на предшествующую терапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумаб), или маловероятно будут отвечать на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)) за счет, например, низкого статуса PD-L1.

[005] В одном аспекте, способ лечения опухоли у субъекта включает выбор субъекта, имеющего опухоль, имеющую плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм², введение субъекту талимогена лагерпарепвека и введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[006] В некоторых вариантах осуществления опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов интерферона гамма (IFN γ) до введения по сравнению с заранее установленным порогом контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 (STAT1), CC-рецептора хемокина типа 5 (CCR5), лиганда 9 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL9), перфорина 1 (PRF1), HLA-DRA, лиганда 10 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL10), лиганда 11 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL11), индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1) и гранзима A (GZMA). В некоторых вариантах осуществления опухоль не экспрессирует сигнатурные гены IFN γ до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[007] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет статус лиганда 1 белка запрограммированной смерти (PD-L1) ниже чем примерно 50% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет статус PD-L1 ниже чем примерно 1% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[008] В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят субъекту интратуморально и/или пембролизумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту системно.

[009] В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят субъекту до введения пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[010] В некоторых вариантах осуществления уменьшение размера инъецированной опухоли и/или уменьшение размера неинъецированной опухоли происходит после введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[011] В некоторых вариантах осуществления плотность инфильтрации CD8⁺ Т-

клетками в опухоли увеличивается после введения талимогена лагерпарепвека. В некоторых вариантах осуществления количество делящихся CD8⁺ Т-клеток, циркулирующих в крови у субъекта, увеличивается после введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[012] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рак пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления меланома представляет кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому, рак молочной железы представляет HER2⁺ рак молочной железы, HER2-HR⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы представляет кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рак мочевого пузыря представляет переходноклеточный рак или уротелиальный рак, рак головы и шеи является рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи, и/или саркома представляет саркому мягких тканей или саркому кости.

[013] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1000 клеток/мм².

[014] В одном аспекте обеспечен способ лечения опухоли у субъекта, которая слабо отвечает или не отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), включающий введение талимогена лагерпарепвека субъекту и введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту.

[015] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм² до введения, опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов интерферона гамма (IFN γ) до введения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA, и/или опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[016] В одном аспекте обеспечен способ лечения опухоли у субъекта, которая прогрессировала во время монотерапии ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапии или анти-PD-1 терапии (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), включающий введение

субъекту талимогена лагерпарепвека и введение субъекту пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[017] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток/мм² до введения, опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до введения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA, и/или опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[018] В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят последовательно в виде начальной дозы с последующей одной или более вторичными дозами. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент вводят последовательно в виде начальной дозы с последующей одной или более вторичными дозами. В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят последовательно в виде начальной дозы с последующей одной или более вторичными дозами, и пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент вводят последовательно и одновременно с одной или более вторичными дозами талимогена лагерпарепвека.

[019] В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят интратуморально, и где пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент вводят системно. В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек и пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент вводят интратуморально.

[020] В одном аспекте обеспечен способ лечения опухоли, имеющей плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм², включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[021] В некоторых вариантах осуществления опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет кожную меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи.

[022] В некоторых вариантах осуществления опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до контактирования, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA.

[023] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до контактирования с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[024] В одном аспекте обеспечен способ лечения опухоли, экспрессирующей более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до лечения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[025] В некоторых вариантах осуществления опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак представляет меланому (например, кожную меланому). В некоторых вариантах осуществления рак представляет рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи).

[026] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток/мм² до контактирования.

[027] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до контактирования с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[028] В одном аспекте, обеспечивается способ лечения опухоли, имеющей статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до лечения, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[029] В некоторых вариантах осуществления опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой

меланому (например, кожную меланому). В некоторых вариантах осуществления рак представляет меланому (например, кожную меланому). В некоторых вариантах осуществления рак представляет рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи).

[030] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток/мм² до контактирования.

[031] В некоторых вариантах осуществления опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до контактирования, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA.

[032] В одном аспекте обеспечен способ лечения опухоли, имеющей плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм², и экспрессирующей более низкие уровни пяти или менее сигнатурных генов IFN γ до лечения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[033] В некоторых вариантах осуществления опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет меланому (например, кожную меланому). В некоторых вариантах осуществления рак представляет рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи).

[034] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до контактирования с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[035] В одном аспекте обеспечен способ лечения опухоли, ранее резистентной к пембролизумабу, варианту пембролизумаба или его антигенсвязывающему фрагменту, у субъекта, затем подвергнутой воздействию талимогена лагерпарепвека, включающий введение субъекту пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

[036] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак, выбранный из

группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет меланому (например, кожную меланому). В некоторых вариантах осуществления рак представляет рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи).

[037] В одном аспекте обеспечен способ визуализации опухоли, резистентной к монотерапии ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапии или анти-PD-1 терапии (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), у субъекта, чувствительного к пембролизумабу, варианту пембролизумаба или его антигенсвязывающему фрагменту, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком.

[038] В некоторых вариантах осуществления образец опухоли, отобранный у субъекта после контактирования опухоли с талимогеном лагерпарепвеком, имеет повышенный уровень одной или любой комбинации CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, IFN γ , CD20+ В-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток и CD56+ клеток по сравнению с образцом опухоли, отобранным до контактирования опухоли с талимогеном лагерпарепвеком.

[039] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками более 1000 клеток/мм² после контактирования с талимогеном лагерпарепвеком.

[040] В некоторых вариантах осуществления образец крови, отобранный у субъекта после контактирования опухоли с талимогеном лагерпарепвеком, имеет повышенный уровень CD8+ Т-клеток и/или CD4+ Т-клеток по сравнению с образцом крови, отобранным у субъекта до контактирования, где необязательно CD8+ Т-клетки являются делящимися CD8+ Т-клетками.

[041] В одном аспекте, способ лечения опухоли у субъекта включает выбор субъекта, имеющего опухоль, имеющую плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток/мм², введение талимогена лагерпарепвека интратуморально в виде начальной дозы с последующей одной или более вторичными дозами и введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту системно в виде начальной дозы с последующей одной или более вторичными дозами.

[042] В некоторых вариантах осуществления вторичные дозы вводят раз в две недели (Q2W). В некоторых вариантах осуществления начальная доза талимогена лагерпарепвека вводится в день 1 недели 1, и вторичная доза талимогена лагерпарепвека вводится в день 1 недели 4, в день 1 недели 6 и затем Q2W. В некоторых вариантах

осуществления начальная доза пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента вводится в день 1 недели 6, и вторичная доза пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента вводится в день 1 недели 8 и затем Q2W.

[043] В некоторых вариантах осуществления начальную дозу талимогена лагерпарепвека вводят в количестве 10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, и вторичные дозы талимогена лагерпарепвека вводят в количестве 10^8 БОЕ/мл.

[044] В некоторых вариантах осуществления начальную дозу пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента вводят в дозе 200 мг, и вторичные дозы пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента вводят в дозе 200 мг.

[045] Краткое описание раскрытия, представленное выше, не является ограничивающим, и другие признаки и преимущества раскрытых биомаркеров и способов будут очевидны из следующих чертежей, подробного описания раскрытия и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

[046] На фиг. 1 представлен дизайн исследования меланомы и клинический ответ на комбинацию талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба. (A) Представлен дизайн фазы 1b исследования. Звездочки указывают время запланированной биопсии опухолей. (B) Представлены сканы компьютерной томографии для двух пациентов с ответом на комбинированную терапию. Метастазы меланомы отмечены синей стрелкой в исходном периоде. (C) Представлена каскадная диаграмма с наилучшим ответом в изменении опухолевой нагрузки по сравнению с исходным уровнем. Для включения пациенты должны были иметь исходные оценки опухолей и ≥ 1 оценки опухолей после исходного периода. (D) Показано изменение опухолевой нагрузки во времени. (E) Представлен анализ выживаемости без прогрессирования Каплана–Мейера. (F) Представлен анализ общей выживаемости Каплана–Мейера.

[047] На фиг. 2 показано, что комбинация талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба была эффективной у пациентов с низкой плотностью CD8 в опухоли. (A) Показана исходная плотность CD8 в биопсиях опухоли в соответствии с частотой ответа. Размер столбцов указывает исходную плотность CD8 в опухолях в исходной биопсии от каждого пациента, и наилучший общий ответ показан на оси x и цветом столбца. Красный: полный ответ (CR); розовый: частичный ответ (PR), черный: прогрессирующее заболевание (PD). (B) Исходный статус PD–L1 по данным ИHC (порог отсечения 1%) и оценка сигнатуры интерферона гамма по данным анализа NanoString показаны под результатом CD8 для каждого пациента. Наилучший общий ответ по каждому исследователю показан на дату окончания август 2016 г. n.a. = результат не доступен.

[048] На фиг.3 показано, что талимоген лагерпарепвек увеличивал плотность CD8 в опухолях у пациентов, отвечающих на комбинацию талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба. (A) Представлены примеры до (неделя 1) и после (неделя 6) введения

талимогена лагерпарепвека и талимогена лагерпарепвека плюс пембролизумаба (неделя 30) плотности CD8⁺ Т-клеток в биопсиях опухоли: визуализация клеток, окрашенных анти-CD8-антителом с красным хромогеном. Окрашивание определяли количественно для областей ткани, представляющих интерес, включая плотность CD8 в опухоли, как показано для опухолей, инъецированных талимогеном лагерпарепвеком. (B) Показана плотность CD8 и (C) гранзима-В Н-показатель, который показан для исходной и после исходной биопсии. Левая сторона на каждой панели показывает результаты в исходном периоде для инъецированных очагов и правая сторона на каждой панели показывает результаты неинъецированных очагов. Пустые кружки указывают результаты биопсии опухоли с истощенными клетками меланомы, но которые имели патологические признаки того, что ранее были инфильтрированы клетками меланомы, такие как отложения меланина. Ответ имеет цветовую кодировку для лучшего общего ответа на каждого исследователя: полный или частичный ответ красным цветом и отсутствие ответа синим цветом. (D) Показано количество CD8 α и (E) показано количество мРНК транскриптов, нормализованных по гамма интерферону, измеренное согласно общей панели иммунного профилирования при раке NanoString.

[049] На фиг. 4 показано, что талимоген лагерпарепвек увеличивает плотность опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и экспрессию PD-L1 в опухолях. Двенадцать цветных иммунофлуоресцентных окрашиваний выполняли на одном предмете стекла из парных биопсий опухоли до и после введения талимогена лагерпарепвека от каждого из 13 пациентов. Оцениваемые маркеры включали S100 (в качестве маркера сегментации меланомы), CD3, CD4, CD8, PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD45RO, Foxp3, CD56, CD68 и CD20. (A) Показан ряд изменений на неделе 6 относительно исходного периода в плотности клеток положительных на маркеры для результатов со статистической значимостью (PD-L1, PD-1, CD8, CD4, CD56, CD20, CD45RO и Foxp3) в виде графиков для неинъецированных образцов (слева) и инъецированных образцов (справа). Среднее изменение для каждого ряда показано горизонтальной линией. Ответ имеет цветовую кодировку для лучшего общего ответа для каждого исследователя: полный или частичный ответ красным цветом и отсутствие ответа синим цветом. (B) Показан пример комбинации окрашивания S100 (синий), CD8 (зеленый) и PD-L1 (красный) при низком (верхний ряд) и высоком (нижний ряд) увеличении для исходной биопсии от пациента, который имел частичный ответ (неделя 1), неделя 6 после введения талимогена лагерпарепвека и неделя 30 после длительного лечения комбинацией талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба. NI: биопсия неинъецированного метастаза; I: биопсия инъецированного метастаза.

[050] На фиг. 5 показаны субпопуляции циркулирующих Т-клеток и экспрессия маркеров активации. Клетки периферической крови, полученные в исходном периоде, на неделе 1, неделе 6, неделе 8 и неделе 30, анализировали проточной цитометрией. (A) Показано кратное изменение абсолютного количества CD3⁺/CD8⁺ клеток. (B) Показано кратное изменение абсолютного количества CD3⁺/CD4⁺ клеток. (C) Показанно

процентное изменение количества Ki67+ (CD3+/CD8+) клеток. (D) Показано процентное изменение количества PD-1+ (CD3+/CD8+) клеток только на неделе 1 и неделе 6, поскольку после начала лечения пембролизумабом окрашивающее антитело конкурировало за один и тот же эпитоп. (E) Показано процентное изменение количества TIM3+ (CD3+/CD8+) клеток. (F) Показано процентное изменение количества BTLA+ (CD3+/CD8+) клеток. Р-значения для сравнения с исходным периодом показаны под данными для каждого визита после исходного периода на основе контрастов из линейного моделирования смешанных эффектов. Ответ имеет цветовую кодировку для лучшего общего ответа для каждого исследователя: полный или частичный ответ красным цветом и отсутствие ответа синим цветом.

[051] На фиг. 6 показано распределение пациентов, включенных в исследование, и доступность биопсии для тестирования биомаркеров.

[052] На фиг. 7 показаны изменения в опухолевой нагрузке в очагах. (A) Показан ответ инъецированных очагов. (B) Показан ответ неинъецированных, невисцеральных очагов. (C) Показан ответ неинъецированного висцерального очага.

[053] На фиг. 8 показано, что респондеры имели увеличение плотности CD8 в инъецированных очагах после введения талимогена лагерпарепвека. Изменения от исходного периода (BL, неделя 1) в плотности CD8, как измерено анализом ИНС после обработки талимогеном лагерпарепвеком, но перед началом комбинированной терапии (W6), представлены для респондеров и нереспондентов по отдельности. Левая панель показывает изменения в инъецированных очагах (Inj), и правая панель показывает изменения в неинъецированных (non Inj) очагах по шкале кратного изменения. Ответ определяли как наилучший общий ответ для каждого исследователя как CR или PR, и отсутствие ответа как PD или SD. Образцы с истощенной опухолью обозначены пустыми кружками. Медианное кратное изменение показано горизонтальной линией (сплошная для всех образцов, пунктирная только для тех, у кого была опухоль).

[054] На фиг. 9 показано, что талимоген лагерпарепвек уменьшает фракцию Treg CD4 Т-клеток в опухолях. Двенадцать цветных иммунофлуоресцентных окрашиваний проводили на одном предметном стекле из парных биопсий опухолей, отобранных до и после введения талимогена лагерпарепвека у каждого из 13 пациентов. Оцениваемые маркеры включали S100 (в качестве маркера сегментации меланомы), CD3, CD4, CD8, PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD45RO, Foxp3, CD56, CD68 и CD20. Изменения относительно исходного периода во фракции Treg CD4 Т-клеток на неделе 6 представлены для неинъецированных образцов (слева) и для инъецированных образцов (справа). Медианное изменение для каждого ряда показано горизонтальной линией. Ответ имеет цветовую кодировку для наилучшего общего ответа для каждого исследователя: полный или частичный ответ красным и отсутствие ответа синим.

[055] На фиг. 10 показаны дополнительные примеры мультипараметрической визуализации (платформа MultiOmyx™) от пациента с частичным ответом на терапию (A) комбинации S100, CD8 и PD-L1 (площадь изображения 0,6 мм² и 0,04 мм²) в исходном

периоде (неделя 1), на неделе 6 после введения талимогена лагерпарепвека и на неделе 30 после длительного лечения комбинацией талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба. (В) Показано окрашивание S100, CD3, CD4 и Foxp3 (площадь изображения 0,6 мм² и 0,04 мм²) для дополнительного пациента.

[056] На фиг. 11 показана панель сигнатурных генов IFN- α в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[057] На фиг. 12 представлен дизайн исследования и схема лечения в фазе 3, в которой субъектов лечат талимогеном лагерпарепвеком плюс пембролизумабом (группа 1) или плацебо плюс пембролизумабом (группа 2) до 24 месяцев с даты введения первой дозы пембролизумаба или до конца лечения, определяемого исчезновением инъецируемых очагов, полным ответом, прогрессированием заболевания согласно шкале IRRC-RECIST или непереносимостью исследуемого лечения (AE). AE, неблагоприятное событие, требующее временного прекращения исследуемого лечения; CR, полный ответ; PD, прогрессирующее заболевание; Rx, лечение; T-VEC, талимоген лагерпарепвек. ^aВ течение 90 (+7) дней после последней дозы талимогена лагерпарепвека или последней дозы пембролизумаба пациенты будут проходить последующее наблюдение на предмет серьезных нежелательных явлений, в зависимости от того, что наступит позднее. ^bДолгосрочное последующее наблюдение будет проводиться каждые 12 недель (± 28 дней) примерно до 60 месяцев после включения последнего субъекта в фазу 3.

Подробное описание примерных вариантов осуществления изобретения

[058] Было установлено, что высокий уровень инфильтрации CD8⁺ Т-клетками, высокий уровень PD-L1 и/или положительная сигнатура гена IFN γ в опухоли необходимы для успешного лечения опухоли с использованием антагонистов PD-1/PD-L1. Действительно, современные методы лечения рака, направленные на рецептор белка запрограммированный гибели 1 клеток (PD-1), показали беспрецедентные показатели долгосрочных клинических ответов у пациентов с различными типами рака, включая регрессию опухоли после терапевтической блокады PD-1, где для получения таких результатов требуется высокий уровень ранее существовавших CD8⁺ Т-клеток (Tumeh et al. (2014) Nature, 515: 568–571). Было установлено, что анти-PD-L1-антитело является эффективным для лечения многочисленных типов рака у пациентов с опухолями, экспрессирующими высокие уровни PD-L1 (Herbst et al. (2014) Nature, 515: 563–7). Кроме того, наличие высокой сигнатуры гена интерферона гамма (IFN γ) в опухоли коррелирует с возможностью лечить опухоль антагонистами PD-1 (WO 2015/094992; заявитель, Merck Sharp & Dohme Corporation).

[059] Неожиданно и совершенно вопреки сложившемуся твердому мнению, что высокий уровень инфильтрации CD8⁺ Т-клетками, высокий уровень PD-L1 и/или положительная сигнатура гена IFN γ необходимы для успешного лечения опухоли с использованием антагониста PD-1, было установлено, что опухоли, имеющие низкий уровень инфильтрации CD8⁺ Т-клетками, низкий или негативный статус PD-L1 и/или низкий или негативный профиль сигнатуры гена IFN-2, можно эффективно лечить

антагонистом PD-1, пембролизумабом с использованием подхода комбинированной терапии с талимогеном лагерпарепвеком. Это открытие представляет первую клиническую демонстрацию того, что талимоген лагерпарепвек может запускать иммунный ответ в опухоли *in vivo*, достаточный для обеспечения эффективного нацеливания на опухоль антагониста PD-1, пембролизумаба.

[060] Кроме того, было обнаружено, что интратуморальное введение талимогена лагерпарепвека благоприятно изменяет микроокружение опухоли инъецированных очагов, например, за счет увеличения инфильтрации CD8⁺ Т-клетками, увеличения экспрессии PD-L1 и/или получения более положительной сигнатуры гена IFN γ , делая тем самым опухолевые клетки более чувствительными к анти-PD-1 терапии. Экспрессия PD-L1 повышалась после лечения талимогеном лагерпарепвеком, но ей противодействовала последующая блокада PD-1 пембролизумабом. После введения талимогена лагерпарепвека в опухолевый очаг, опухолевые антигенспецифические CD8⁺ Т-клетки передвигались и проникали как в локальный очаг поражения, так и в отдаленные метастатические очаги. Используя комбинированную терапию пембролизумабом и талимогеном лагерпарепвеком, анти-PD-1 блокада функционировала для противодействия опосредованному белками контрольных точек ингибированию иммунного ответа.

[061] Таким образом, введение онколитического вируса делало «холодные» опухоли (т. е. опухоли, демонстрирующие низкий уровень иммунной инфильтрации (например, CD8⁺ Т-клетками), негативную сигнатуру гена IFN γ и/или низкий статус PD-L1), более чувствительными к терапии блокадой пембролизумабом, посредством превращения таких опухолей в «горячие» опухоли (т. е. опухоли, демонстрирующие высокий уровень иммунной инфильтрации (например, CD8⁺ Т-клетками), положительную сигнатуру гена IFN γ и/или высокий статус PD-L1). Следовательно, опухоли, которые ранее были минимально отвечающими или не отвечающими на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом или его вариантом или антигенсвязывающим фрагментом)), могут стать чувствительными к терапии пембролизумабом или его вариантом или антигенсвязывающим фрагментом.

[062] Следовательно, в одном варианте осуществления комбинация пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и талимогена лагерпарепвека используется для повышения величины опухолеспецифических Т-клеточных ответов по сравнению с одним пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом у пациентов. Данный эффект может особенно наблюдаться при ранее не поддававшейся лечению, неоперабельной, стабильной меланоме IIIb-IV стадии. Комбинация пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и талимогена лагерпарепвека предназначена для усиления системного противоопухолевого ответа на опухолевые антигены после литической репликации талимогена лагерпарепвека в

опухолях. Следовательно, комбинированная терапия может привести к усиленному разрушению инъецированных опухолей, а также неинъецированных/отдаленных опухолей, включая микрометастатические очаги, с повышением уровня общего ответа опухоли и продолжительности ответа. В целом, эти эффекты могут способствовать повышению общей выживаемости, особенно по сравнению с монотерапией ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапией или анти-PD-1 терапией (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)). Применение талимогена лагерпарепвека в комбинации с пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом, предназначено для усиления активации Т-клеток посредством различных механизмов, соответственно повышения презентации опухолевых антигенов, опосредованной дендритными клетками (Kaufman et al., *Ann Surg Oncol.*, 17 (3): 718–730, 2010) после высвобождения опухолевых антигенов репликацией литического вируса, усиленной за счет локальной экспрессии GM-CSF, и антагонистической иммунной толерантности посредством блокирования ингибирующих сигналов, опосредованных ингибитором иммунных контрольных точек (Karadia and Fong, *J. Clin. Oncol.*, 23: 8926–8928, 2005).

[063] В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с холодной опухолью, имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкий или негативный статус PD-L1 и/или негативную сигнатуру гена IFN γ , лечат комбинацией пембролизумаба, варианта пембролизумаба или антигена его связывающий фрагмент и талимогена лагерпарепвека. Такие опухоли включают, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2⁺, HER2[–](HR⁺), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы (например, кастрационно-резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[064] В еще одних вариантах осуществления, «горячая» опухоль (или рак, ассоциированный с горячей опухолью) (т. е. рак, который не ассоциирован с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и/или низкого уровня сигнатуры экспрессии гена IFN γ), которая отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например,

пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)) лечат комбинацией пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и талимогена лагерпарепвека. Такие виды рака включают, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи), назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода, рак молочной железы (например, ER+/HER2– рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно–кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медиастинальные В–крупноклеточные лимфомы, лимфому Ходжкина) и мезотелиому.

Определения

[065] Для того, чтобы изобретение было более понятным, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если специально не определено где–либо еще в этом документе, то все другие технические и научные термины, используемые здесь, имеют значение, общепринятое для специалиста в области техники, к которой относится это изобретение.

[066] Как здесь используется, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов, такие как «а», «an» и «the», включают соответствующие им множественные ссылки, если контекст явно не предписывает иное.

[067] «Примерно», когда используется для изменения числового параметра (например, балла оценки геной сигнатуры для геной сигнатуры, обсуждаемой здесь, или дозы пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента или талимогена лагерпарепвека, или продолжительности лечения пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом или талимогеном лагерпарепвеком) означает, что параметр может варьироваться на 10% выше или ниже указанного числового значения для этого параметра. Например, геновая сигнатура, состоящая примерно из 10 генов, может иметь от 9 до 11 генов.

[068] «Введение» и «лечение», когда этот термин используется по отношению к животному, человеку, экспериментальному объекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, относится к контактированию экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки включает контактирование реагента с клеткой, а также контактирование реагента с жидкостью, где жидкость контактирует с клеткой. Термин «введение» и «лечение» также означает обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, реагентом, диагностическим

агентом, связывающим агентом или другой клеткой.

[069] Как здесь используется, термин «антитело» относится к любой форме антитела, которая проявляет желаемую биологическую или связывающую активность. Таким образом, он используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, но не ограничивается этим, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела, химерные антитела и верблюжьи однодоменные антитела. «Родительские антитела» представляют собой антитела, полученные воздействием антигена на иммунную систему до модификации антител для предполагаемого применения, такой как гуманизация антитела для применения в качестве терапевтического средства для человека.

[070] В общем, основная структурная единица антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50–70 кДа). Аминоконцевой участок каждой цепи включает переменную область примерно из 100–110 или более аминокислот, в основном ответственную за распознавание антигена. Карбоксиконцевой участок тяжелой цепи определяет границы константной области, в основном ответственной за эффекторную функцию. Обычно легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Внутри легкой и тяжелой цепей переменные и константные области соединены «J» участком примерно из 12 или более аминокислот, где тяжелая цепь также включает «D» участок примерно из 10 аминокислот. См. в общем, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

[071] Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий участок антитела. Таким образом, как правило, интактное антитело имеет два участка связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два участка связывания, в общем, одинаковы.

[072] Как правило, переменные области как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гиперпеременные области, также называемые определяющими комплементарность участками (CDR), которые расположены в относительно консервативных каркасных областях (FR). CDR обычно распределены по каркасным областям, что обеспечивает связывание с конкретным эпитопом. Как правило, от N-конца к C-концу переменные области как легкой, так и тяжелой цепей включают FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждой области, как правило, соответствует определениям, представленным в «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91–3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem., 32:1–75; Kabat et al. (1977) J. Biol. Chem., 252:6609–6616; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol., 196:901–917 или Chothia et al. (1989)

Nature, 342:878–88.

[073] Как здесь используется, термин «гипервариабельная область» относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из «определяющего комплементарность участка» или «CDR» (т. е. LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в вариабельной области легкой цепи и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в вариабельной области тяжелой цепи). См. Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (defining the CDR regions of an antibody by sequence)); см. также Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901–917 (определение областей CDR антитела по структуре). Как здесь используется, термин «каркасные» или «FR» остатки относится к тем остаткам вариабельной области, которые не являются остатками гипервариабельной области, определенными здесь как остатки CDR.

[074] Как здесь используется, если не указано иное, то «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» относится к антигенсвязывающим фрагментам антител, т. е. фрагментам антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, который связывается полноразмерным антителом, например, фрагменты, которые сохраняют один или более участков CDR. Примеры связывающих фрагментов антител включают, не ограничиваясь этим, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; димеры; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, например, scFv; нанотела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[075] Антитело, которое «специфически связывается» с определенным белком–мишенью, представляет собой антитело, которое проявляет преимущественное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но для этой специфичности не требуется абсолютная специфичность связывания. Антитело считается «специфичным» для его предполагаемой мишени, если его связывание определяет присутствие белка–мишени в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные результаты. Антитела или их связывающие фрагменты, используемые в настоящем изобретении, будут связываться с белком–мишенью с аффинностью, которая, по меньшей мере, в два раза выше, предпочтительно, по меньшей мере, в десять раз выше, более предпочтительно, по меньшей мере, в 20 раз выше и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, в 100 раз выше, чем аффинность с белками, которые не являются мишенью. Как здесь используется, полагается, что антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, например, аминокислотную последовательность молекулы зрелого человеческого PD–1 или человеческого PD–L1, если оно связывается с полипептидами, содержащими эту последовательность, но не связывается с белками, в которых эта последовательность отсутствует.

[076] «Химерное антитело» относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в

антителе, полученном от определенного вида (например, человека) или относящемся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителе, полученном от другого вида (например, мыши) или относящемся к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, если они проявляют желаемую биологическую активность.

[077] «Человеческое антитело» относится к антителу, которое содержит только последовательности белка человеческого иммуноглобулина. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если они продуцируются в организме мыши, мышинной клетке или в гибридоме, полученной из мышинной клетки. Аналогично, «мышинное антитело» или «крысиное антитело» относится к антителу, которое содержит только последовательности иммуноглобулина мыши или крысы соответственно.

[078] «Гуманизированное антитело» относится к формам антител, которые содержат последовательности антител, не являющихся человеческими (например, мышинных), а также человеческих антител. Такие антитела содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, отличного от иммуноглобулина человека. В общем, гуманизированное антитело будет включать, по существу, все, по меньшей мере, одну, и, как правило, две переменные области, в которых все или, по существу, все гиперпеременные петли соответствуют таковым у иммуноглобулина, отличного от иммуноглобулина человека, и все или, по существу, все области FR являются последовательностями иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно таковой иммуноглобулина человека. Приставку «hum», «hu» или «h» добавляется к обозначениям клонов антител, когда необходимо отличить гуманизированные антитела от родительских антител грызунов. Гуманизированные формы антител грызунов обычно содержат одинаковые последовательности CDR родительских антител грызунов, хотя некоторые аминокислотные замены могут быть включены для повышения аффинности, повышения стабильности гуманизированного антитела или по другим причинам.

[079] «Биотерапевтический агент» означает биологическую молекулу, такую как антитело, которая блокирует передачу сигналов лиганда/рецептора на любом биологическом пути, который сохраняет поддержание и/или рост опухоли или подавляет противоопухолевый иммунный ответ и/или рекрутирует инфильтрацию CD8⁺ Т-клеток в опухоль.

[080] Термины «рак», «раковый» или «злокачественный» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры злокачественных новообразований, ассоциированных с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно

500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и/или низкого уровня сигнатуры экспрессии гена IFN γ , включают, не ограничиваясь этим, карциному, лимфому, лейкоз, бластому и саркому.

[081] Примеры конкретных видов рака, которые ассоциированы с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и/или низкого уровня сигнатуры экспрессии гена IFN γ , включают, не ограничиваясь этим: меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (рецидивирующую или плоскоклеточную карциному головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2⁺, HER2-(HR⁺), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы, например, кастрационно-резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[082] Примеры конкретных видов рака, которые отвечают на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), который может или может быть не ассоциирован с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и/или негативной сигнатуры гена IFN γ , включают, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи, назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода), рак молочной железы (например, ER⁺/HER2⁻ рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина) или мезотелиому. В некоторых вариантах осуществления конкретный тип злокачественных опухолей может иметь одну или более подгрупп, которые являются «горячими» (т. е., которые не ассоциированы с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток на 1 мм²

образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и/или негативной сигнатуры гена IFN γ) и одну или более подгрупп, которые являются «холодными» (т. е. которые ассоциированы с одним или более из плотности инфильтрации CD8 $^{+}$ Т-клетками ниже чем 1000 клеток на 1 мм 2 образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и/или негативной сигнатуры гена IFN γ).

[083] Особенно предпочтительные виды рака, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают таковые, которые характеризуются одной или любой комбинацией из: низкой плотности CD8 $^{+}$ Т-клеток; низкой или негативной сигнатуры интерферона гамма; и низкого или негативного статуса PD-L1. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль является «холодной», которая относится к опухоли, проявляющей низкий уровень иммунной инфильтрации, например, CD8 $^{+}$ Т-клетками, которая обычно не отвечает на терапию блокадой анти-PD-1, посредством превращения таких опухолей в «горячие» опухоли. В некоторых вариантах осуществления «холодная» опухоль имеет плотность CD8 $^{+}$ Т-клеток, ниже или равную примерно 3000, например, ниже чем примерно 3000, примерно 2900, примерно 2800, примерно 2700, примерно 2600, примерно 2500, примерно 2400, примерно 2300, примерно 2200, примерно 2100, примерно 2000, примерно 1900, примерно 1800, примерно 1700, примерно 1600, примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток на 1 мм 2 или 1 мл (т.е. 1 см 3) образца.

[084] Как здесь используется, термин «горячая» опухоль представляет собой опухоль, которая демонстрирует более высокие уровни иммунной инфильтрации, например, CD8 $^{+}$ Т-клетками, чем «холодные» опухоли. В некоторых вариантах осуществления «горячая» опухоль имеет плотность CD8 $^{+}$ Т-клеток более чем примерно 3000 клеток, например, более примерно 4000 клеток или более примерно 5000 клеток на 1 мм 2 образца.

[085] CD8 $^{+}$ (цитотоксические) Т-клетки образуются в тимусе и экспрессируют Т-клеточный рецептор. CD8 $^{+}$ Т-клетки экспрессируют димерный корецептор, CD8, обычно состоящий из одной цепи CD8 α и одной цепи CD8 β . CD8 $^{+}$ Т-клетки распознают пептиды, презентированные молекулами МНС класса I, обнаруженные на поверхности всех ядросодержащих клеток. Гетеродимер CD8 связывается с консервативной частью (областью $\alpha 3$) молекул МНС класса I во время взаимодействия Т-клеток/антигенпрезентирующих клеток. Когда CD8 $^{+}$ Т-клетка распознает антиген и становится активированной, то она может секретировать цитокины, продуцировать и высвобождать цитотоксические гранулы и активировать каскад каспаз для уничтожения злокачественных клеток.

[086] Высокая плотность опухоль-инфильтрирующих CD8 $^{+}$ Т-клеток часто ассоциируется в данной области с благоприятными клиническими исходами при очень широком ряде злокачественных опухолей и указывает на продолжающийся иммунный ответ хозяина, и прогностическую значимость высокой плотности опухоль-

инфильтрирующих лимфоцитов для клинического исхода оценивали для различных злокачественных новообразований (Zhang et al. (2003) NEJM, 348: 203–13; Galon et al. (2006) Science, 313: 1960–64; Gao et al. (2007) J. Clin. Oncol., 25: 2586–93; Gooden et al. (2011) Br. J. Cancer, 105: 93–103).

[087] Термины «плотность CD8», «плотность CD8+» или «плотность CD8+ Т-клеток» относятся к количеству CD8+ Т-клеток, присутствующих в образце, например, в образце опухоли. В примерных вариантах осуществления плотность CD8+ Т-клеток представляет собой количество клеток, присутствующих в образце, например, в образце площадью 1 мм² (например, полученном пункционной биопсией) или образце объемом 1 мл (т.е. 1 см³) (например, полученном жидкой биопсией) опухоли от субъекта. В некоторых примерных вариантах осуществления низкая плотность CD8+ Т-клеток (которая связана с «холодной» опухолью) составляет ниже чем примерно 3000 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, менее чем примерно 2900 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2800 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2700 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2600 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2400 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2300 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 2200 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже примерно 2100 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже примерно 2000 клеток на 1 мм² образца, ниже примерно 1900 клеток на 1 мм² образца, ниже примерно 1800 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже примерно 1700 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1600 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1400 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1300 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1200 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1100 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 1000 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 900 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 800 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 700 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 600 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 400 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 300 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, ниже чем примерно 200 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца или ниже чем примерно 100 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца. В некоторых примерных вариантах осуществления низкая плотность CD8+ Т-клеток составляет примерно от 3000 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2900 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2800 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2700 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2600 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2500 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2400 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2300 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2200 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2100

до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 2000 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1900 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1800 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1700 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1600 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образец, примерно от 1500 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1400 до 600 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1300 до 700 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1200 до 800 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 1100 до 900 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, или примерно от 1050 до 950 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца. В некоторых примерных вариантах осуществления низкая плотность CD8⁺ T-клеток составляет примерно от 10 до 1000 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 20 до 900 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 30 до 800 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 40 до 700 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 50 до 600 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 60 до 500 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 70 до 400 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца, примерно от 80 до 300 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца или примерно от 90 до 100 клеток на 1 мм² или на 1 мл образца. В некоторых примерных вариантах осуществления образец не содержит детектируемых CD8⁺ T-клеток.

[088] Как здесь используется, термин «CDR» или «CDR» означает определяющий комплементарность участок(и) в вариабельной области иммуноглобулина, определенный с использованием системы нумерации Kabat, если не указано иное.

[089] «Ингибитор контрольных точек» относится к молекуле, которая полностью или частично уменьшает, ингибирует, интерферирует или модулирует один или более белков контрольных точек. Белки контрольных точек регулируют активацию или функцию T-клеток. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86; и PD1 и его лиганды PDL1 и PDL2 (Pardoll (2012) *Nature Reviews Cancer*, 12: 252–264). Эти белки ответственны за костимулирующие или ингибирующие взаимодействия T-клеточных ответов. Белки контрольных точек регулируют и поддерживают собственную толерантность, а также продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек включают антитела или могут быть получены из антител.

[090] «Химиотерапевтический агент» представляет химическое соединение, пригодное для лечения рака. Классы химиотерапевтических агентов включают, не ограничиваясь этим: алкилирующие агенты, антиметаболиты, ингибиторы киназ, растительные алкалоиды, яды митотического веретена, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, фотосенсибилизаторы, антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), антагонисты прогестеронов, негативные регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD), антагонисты рецепторов эстрогенов, агонисты лютеинизирующего гормона-высвобождающего гормона, антиандрогены, ингибиторы ароматазы, ингибиторы EGFR, ингибиторы VEGF, антисмысловые олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию

генов, вовлеченных в аномальную пролиферацию или рост опухолей. Химиотерапевтические агенты, используемые в способах лечения по настоящему изобретению, включают цитостатические и/или цитотоксические агенты.

[091] Как здесь используется, «Clothia» означает систему нумерации антител, описанную в публикации Al-Lazikani et al., JMB, 273: 927–948 (1997).

[092] «Консервативно модифицированные варианты» или «консервативная замена» относится к заменам аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими сходные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформация и жесткость основной цепи и т. д.) так что изменения часто могут быть сделаны без изменения (или существенного изменения) биологической активности или другого желаемого свойства белка, такого как аффинность и/или специфичность к антигену. Специалистам в данной области понятно, что, как правило, единичные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4 Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально сходных аминокислот с меньшей вероятностью будут нарушать биологическую активность.

[093] «Включающий» или варианты, такие как «содержат», «содержит» или «состоит из», используются по тексту описания и в формуле изобретения во включающем смысле, т. е. для указания наличия заявленных признаков, но не для исключения наличия или добавления дополнительных признаков, которые могут существенно улучшить функционирование или применимость любого из вариантов осуществления изобретения, если контекст не требует иного за счет выражения или необходимого значения.

[094] «По существу состоит из», и варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые по тексту описания и в формуле изобретения, указывают на включение любых перечисленных элементов или групп элементов и необязательное включение других элементов, аналогичных или отличающихся от перечисленных элементов, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного режима, способа или композиции введения. В качестве неограничивающего примера, если балл оценки геной сигнатуры определяется как суммарный балл экспрессии РНК для набора генов, который состоит из указанного перечня генов, то специалист в данной области понимает, что этот балл оценки геной сигнатуры может включать уровень экспрессии РНК, который определен для одного или более дополнительных генов, предпочтительно не более трех дополнительных генов, если такое включение не оказывает существенного влияния на прогностическую силу.

[095] Как здесь используется, термин «каркасная область» или «FR» означает переменные области иммуноглобулина, исключая области CDR.

[096] «Гомология» относится к сходству последовательностей между двумя полипептидными последовательностями, когда они оптимально выравнены. Когда положение в обеих двух сравниваемых последовательностях занято одной и той же

аминокислотной мономерной субъединицей, например, если положение в CDR легкой цепи двух разных Ab занято аланином, то эти два Ab гомологичны в этом положении. Процент гомологии представляет собой количество гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленное на общее количество сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 8 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, когда последовательности оптимально выравнены, то эти две последовательности гомологичны на 80%. Как правило, сравнение проводится, когда две последовательности выравнены для получения максимальной процентной гомологии. Например, сравнение может быть выполнено с помощью алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбраны таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих референсных последовательностей.

[097] Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, часто используемым для анализа последовательностей: алгоритмы BLAST: Altschul S. F. et al., (1990) *J. Mol. Biol.*, 215:403–410; Gish W. et al. (1993) *Nature Genet.*, 3:266–272; Madden T. L. et al. (1996) *Meth. Enzymol.*, 266:131–141; Altschul S. F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402; Zhang J. et al. (1997) *Genome Res.*, 7:649–656; Wootton J. C. et al. (1993) *Comput. Chem.*, 17:149–163; Hancock J. M. et al. (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10:67–70; системы оценки выравнивания: Dayhoff M. O. et al., «A model of evolutionary change in proteins» in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345–352, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, D.C.; Schwartz, R. M. et al., «Matrices for detecting distant relationships.» in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 353–358, *Natl. Biomed. Res. Found.*, Washington, D.C.; Altschul, S. F., (1991) *J. Mol. Biol.* 219:555–565; States, D. J., et al., (1991) *Methods* 3:66–70; Henikoff, S., et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915–10919; Altschul, S. F., et al., (1993) *J. Mol. Evol.* 36:290–300; статистика выравнивания: Karlin S. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2264–2268; Karlin S. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873–5877; Dembo A. et al. (1994) *Ann. Prob.*, 22:2022–2039; и Altschul S. F. «Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments.» in *Theoretical and Computational Methods in Genome Research* (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1–14, Plenum, N.Y.

[098] «Выделенное антитело» и «выделенный фрагмент антитела» относится к статусу очистки и в таком контексте означает, что указанная молекула по существу не содержит других биологических молекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как клеточный дебрис и культуральная среда. Как правило, термин «выделенный» не предназначен для обозначения полного отсутствия такого материала или отсутствия воды, буферов или солей, если они не присутствуют в количествах, которые по существу препятствуют экспериментальному или терапевтическому применению связывающего соединения, описанного здесь.

[099] «Kabat» в контексте настоящего описания означает систему выравнивания и нумерации иммуноглобулинов, впервые разработанную Elvin A. Kabat ((1991) «Sequences

of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.).

[0100] Как здесь используется, термин «моноклональное антитело» или «mAb», или «Mab», относится к популяции по существу гомогенных антител, т. е. молекулы антител, составляющие эту популяцию, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. В противоположность, препараты обычных (поликлональных) антител обычно включают множество различных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в их вариабельных областях, в частности, их CDR, которые обычно специфичны для разных эпитопов. Прилагательное «моноклональный» указывает на характер антитела, т.е. на тот факт, что оно получено по существу из гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые можно применять по настоящему изобретению, можно получить гибридным методом, впервые описанным Kohler et al. (1975) *Nature*, 256: 495, или можно получить методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методик, описанных в публикациях Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624–628 и Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597, например, см. также Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116: 731.

[0101] «Интерферон гамма» и «IFN γ » (также называемый иммунным или интерфероном типа II) относится к плейотропному цитокину, участвующему в регуляции практически всех фаз иммунных и воспалительных ответов, включая активацию, рост и дифференцировку Т-клеток, В-клеток, макрофагов, NK-клеток и других типов клеток, таких как эндотелиальные клетки и фибробласты. IFN γ усиливает экспрессию МНС на антигенпрезентирующих клетках, и также играет важную роль в активации лимфоцитов для усиления противоопухолевых эффектов.

[0102] IFN γ может способствовать сдерживанию прогрессирования и роста опухоли посредством увеличения презентации опухолевого антигена опухолеспецифическим Т-клеткам и повышения чувствительности к цитотоксичности NK-клеток. Помимо стимуляции иммунного ответа на опухоль, IFN γ может также индуцировать экспрессию факторов, подавляющих опухоль.

[0103] Как здесь используется, термин «генетически модифицированный онколитический вирус» относится к онколитическому вирусу, который был модифицирован по сравнению с вариантом вируса дикого типа, обычно с делецией и/или инсерцией одного или более генов. Предпочтительным генетически модифицированным онколитическим вирусом по изобретению является талимоген лагерпарепвек, также известный как IMLYGIC[®] (INN=талимоген лагерпарепвек), генно-инженерный вирус герпеса, который коммерчески доступен от Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA). Талимоген лагерпарепвек описан, например, в WO 2014036412, включенной здесь посредством

ссылки во всей полноте для всех целей.

[0104] Талимоген лагерпарепвек, HSV-1 (штамм JS1) ICP34.5-/ ICP47-/hGM-CSF (ранее известный как OncoVex^{GM-CSF}), представляет собой онколитический иммунотерапевтический препарат, вводимый интратуморально, содержащий усиливающий иммунитет HSV-1, который избирательно реплицируется в солидных опухолях (Lui et al., *Gene Therapy*, 10: 292–303, 2003; патент США № 7223593 и патент США № 7537924). HSV-1 был получен из штамма JS1, депонированного в Европейской коллекции клеточных культур (ECAAC)) под инвентарным номером 01010209. В талимогене лагерпарепвеке гены вируса HSV-1, кодирующие ICP34.5, были функционально делецированы. Функциональная делеция ICP34.5, который функционирует в качестве фактора вирулентности во время инфекции HSV, ограничивает репликацию в неделящихся клетках и делает вирус непатогенным. Кроме того, в талимогене лагерпарепвеке функционально делецирован ген вируса HSV-1, кодирующий ICP47 (который блокирует презентацию вирусного антигена молекулам главного комплекса гистосовместимости класса I и II). Функциональная делеция ICP47 также приводит к более ранней экспрессии US11, гена, который способствует росту вируса в опухолевых клетках без снижения селективности для опухоли. Наконец, кодирующая последовательность человеческого GM-CSF, цитокина, участвующего в стимуляции иммунных ответов, была вставлена в вирусный геном талимогена лагерпарепвека. Инсерция гена, кодирующего GM-CSF человека, такова, что он заменяет практически весь ген ICP34.5, гарантируя, что любое потенциальное событие рекомбинации между талимогеном лагерпарепвеком и вирусом дикого типа может привести только к дефектному, непатогенному вирусу и не может привести к генерации вируса дикого типа, несущего ген человеческого GM-CSF. Ген тимидинкиназы (TK) HSV остается интактным в талимогене лагерпарепвеке, что делает вирус чувствительным к противовирусным агентам, таким как ацикловир. Таким образом, ацикловир может быть использован для блокирования репликации талимогена лагерпарепвека, если это необходимо.

[0105] В фазе 3 предшествующего клинического испытания интратуморальная инъекция талимогена лагерпарепвека в метастазы меланомы повышала долгосрочную частоту ответа по сравнению с подкожным введением GM-CSF у пациентов с прогрессирующей меланомой (Andtbacka et al. (2015). *Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma*. *J. Clin. Oncol.*, 33, 2780–2788). Многообещающая противоопухолевая активность также была показана, когда талимоген лагерпарепвек вводили вместе с ингибитором контрольных точек, ипилимумабом, который блокирует антиген 4 цитотоксических Т-клеток (CTLA-4) (Chesney J., Collichio F., Andtbacka R.H., Puzanov I., Glaspy J.A., Milhem M., Hamid O., Cranmer L., Saenger Y., Ross M. et al. (2016). *Interim safety and efficacy of a randomized (1:1), open-label phase 2 study of talimogene laherparepvec (T) and ipilimumab (I) vs I alone in unresected, stage IIIB–IV melanoma*. *Ann. Oncol.*, 27 (6), 379–400; Puzanov I., Milhem M.M., Minor D., Hamid O., Li A., Chen L., Chastain M., Gorski K.S., Anderson A., Chou J., et al. (2016). *Talimogene*

Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB–IV Melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 34, 2619–2626).

[0106] Талимоген лагерпарепвек (IMLYGIC®) был разрешен для применения в качестве монотерапии для лечения метастатической меланомы в США, Европейском союзе и Австралии в 2015 году. В OPTiM, мультицентровом клиническом исследовании в фазе 3, в которое были включены пациенты с метастатической меланомой, которую невозможно было удалить хирургическим путем, пациенты, которые получали талимоген лагерпарепвек, значительно чаще испытывали долгосрочный ответ по сравнению с пациентами, получавшими сравнительную терапию GM-CSF (Andtbacka R.H.I. et al., *J. Clin. Oncol.*, 33: 2780–2788 (2015)).

[0107] Кроме того, безопасность HSV с функционально делецированным ICP34.5 была продемонстрирована в многочисленных клинических исследованиях (MacKie et al., *Lancet*, 357: 525–526, 2001; Markert et al., *Gene Ther.*, 7: 867–874, 2000; Rampling et al., *Gene Ther.*, 7: 859–866, 2000; Sundaresan et al., *J. Virol.*, 74: 3822–3841, 2000; Hunter et al., *J. Virol* Aug; 73 (8): 6319–6326, 1999).

[0108] Талимоген лагерпарепвек обеспечивает прямой онколитический эффект посредством репликации вируса в опухоли и индукции противоопухолевого иммунного ответа, усиленного локальной экспрессией GM-CSF. Предполагаемые клинические эффекты включают, не ограничиваясь этим, разрушение инъецированных опухолей; разрушение локальных, локально–региональных и отдаленных неинъецированных опухолей; уменьшение развития новых метастазов; снижение скорости общего прогрессирования; и долгосрочную общую выживаемость.

[0109] Талимоген лагерпарепвек был тестируван в отношении эффективности на различных мышинных моделях опухолей *in vitro* (клеточной линии) и *in vivo*, и было показано, что он элиминирует опухоли или существенно ингибирует их рост в дозах, сравнимых с дозами, применяемыми в клинических исследованиях. Результаты доклинической оценки также подтвердили, что GM-CSF усиливает генерируемый иммунный ответ, усиливая ответы как инъецированных, так и неинъецированных опухолей, и что повышенные поверхностные уровни молекул МНС класса I появляются в результате делеции ICP47. Талимоген лагерпарепвек вводили нормальным мышам и мышам с опухолями для оценки его безопасности. В общем, вирус хорошо переносится, и дозы до 1×10^8 БОЕ/дозу не вызывают никаких признаков токсичности (см., например, Liu et al., *Gene Ther.*, 10: 292–303, 2003).

[0110] Клинические исследования проводились или проводятся при нескольких типах опухолей на поздних стадиях (прогрессирующие солидные опухоли, меланома, плоскоклеточный рак головы и шеи и рак поджелудочной железы) с участием более чем 400 субъектов, которых лечили талимогеном лагерпарепвеком (см., например, Hu et al., *Clin. Can. Res.*, 12: 6737–6747, 2006; Harrington et al., *J. Clin. Oncol.*, 27 (15a): abstract 6018, 2009; Kaufman et al., *Ann. Surgic. Oncol.*, 17: 718–730, 2010; Kaufman and Bines, *Future Oncol.*, 6 (6): 941–949, 2010).

[0111] «Олигонуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, длина которой обычно составляет от 5 до 100 смежных оснований, и наиболее часто в пределах 10–50, 10–40, 10–30, 10–25, 10–20, 15–50, 15–40, 15–30, 15–25, 15–20, 20–50, 20–40, 20–30 или 20–25 смежных оснований в длину.

[0112] «Пациент» или «субъект» относится к любому отдельному субъекту, для которого требуется лечение или который участвует в клиническом испытании, эпидемиологическом исследовании, или он служит в качестве контроля, включая людей, приматов, отличных от человека, ветеринарных пациентов млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, лошади, собаки, кошки и тому подобное, и экспериментальных животных, таких как приматы, отличные от человека, крысы, мыши, собаки, кролики и тому подобное.

[0113] Пембролизумаб является гуманизированным моноклональным антителом, которое связывается и блокирует PD–1. Пембролизумаб функционирует посредством повышения способности иммунной системы организма выявлять и бороться с опухолевыми клетками, блокируя взаимодействие между PD–1 и его лигандами, PD–L1 и PD–L2, тем самым активируя Т–лимфоциты, которые могут поражать как опухолевые клетки, так и здоровые клетки.

[0114] Известно, что пембролизумаб в виде монотерапии используется в лечении меланомы, немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточной карциномы головы и шеи у пораженных субъектов, имеющих более высокую исходную плотность инфильтрации CD8+ Т–клетками, сигнатуру гена IFN γ и экспрессию PD–L1, чем уровни, обнаруженные у не отвечающих на лечение субъектов. Специалистам в данной области понятно, что это ограничивает применимость пембролизумаба у субъектов с низкой плотностью CD8+ Т–клеток, негативной сигнатурой гена IFN γ и/или низким или негативным статусом PD–L1.

[0115] Как здесь используется, термин «пембролизумаб» относится к коммерчески доступному моноклональному антителу под торговым названием KEYTRUDA[®] (Merck Sharp & Dohme Corp., Whitehouse Station, NJ), описанному в WO2016196173 и патентах США № 8354509 и 8900587, которые включены здесь посредством ссылки во всей полноте для всех целей, а также его вариантам и антигенсвязывающим фрагментам. Пембролизумаб можно охарактеризовать одной или любой комбинацией последовательностей домена тяжелой цепи, домена легкой цепи, вариабельной области тяжелой цепи, вариабельной области легкой цепи, определяющего комплементарность участка тяжелой цепи и определяющего комплементарность участка легкой цепи, приведенных ниже.

[0116] Пембролизумаб может содержать последовательность тяжелой цепи, показанную ниже:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGI
NPSNGGTNFKNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY
WGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP

CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:1), и
 последовательность легкой цепи, показанную ниже:
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQ
 APRLLIYLASYLESVGPARGSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO:2).

[0117] Пембролизумаб может содержать последовательность вариабельной области
 тяжелой цепи (VH), показанную ниже:
 QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
 GTNFKNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQ
 TTVTSS (SEQ ID NO:3), и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL),
 показанную ниже:
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES
 GVPARGSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID
 NO:4).

[0118] Пембролизумаб может содержать последовательность следующих
 определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR): NYMY (HCDR1,
 SEQ ID NO:5); GINPSNGGTNFK (HCDR2, SEQ ID NO:6); и RYRFDMGFDY (HCDR3,
 SEQ ID NO:7).

[0119] Пембролизумаб может содержать последовательность следующих
 определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR): RASKGVSTSGYSYLH
 (LCDR1, SEQ ID NO:8); LASYLES (LCDR2, SEQ ID NO:9); и QHSRDLPLT (LCDR3, SEQ
 ID NO:10).

[0120] В некоторых вариантах осуществления обеспечивается пембролизумаб,
 вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR
 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5, 6 и 7 и CDR легкой цепи SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

[0121] В еще одних вариантах осуществления обеспечивается пембролизумаб,
 вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий
 последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи из пары последовательностей
 VH/VL SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

[0122] В еще одних предпочтительных вариантах осуществления обеспечивается
 пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент,
 содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 3 или ее
 вариант, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 4 или ее
 вариант. В еще одних вариантах осуществления вариант пембролизумаба или его
 антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи,

содержащую последовательность, по меньшей мере, с 80% гомологией или идентичностью последовательности (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) с SEQ ID NO: 3, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере, с 80% гомологией или идентичностью последовательности (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) с SEQ ID NO: 4.

[0123] Как здесь используется, термин «вариант последовательности вариабельной области тяжелой цепи» представляет собой последовательность, которая идентична референсной последовательности, за исключением того, что имеет до 17 консервативных аминокислотных замен в каркасной области (т. е. вне CDR), и предпочтительно имеет менее десяти, девяти, восьми, семи, шести или пяти консервативных аминокислотных замен в каркасной области. Как здесь используется, термин «вариант последовательности вариабельной области легкой цепи» представляет собой последовательность, которая идентична референсной последовательности, за исключением того, что имеет до пяти консервативных аминокислотных замен в каркасной области (т. е. вне CDR) и предпочтительно имеет менее четырех, трех или двух консервативных аминокислотных замен в каркасной области.

[0124] В еще одних вариантах осуществления обеспечивается пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 1 или ее вариант, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 2 или ее вариант. В еще одних вариантах осуществления вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, по меньшей мере, с 80% гомологией или идентичностью последовательности (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) с SEQ ID NO: 1, и/или легкую цепь, содержащую последовательность, по меньшей мере, с 80% гомологией или идентичностью последовательности (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) с SEQ ID NO: 2.

[0125] Как здесь используется, термин «вариант пембролизумаба» относится к моноклональному антителу, которое содержит последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, которые идентичны последовательностям пембролизумаба, за исключением того, что имеет до пяти консервативных аминокислотных замен в каркасной области (т.е. вне CDR), и предпочтительно имеет менее четырех, трех или двух консервативных аминокислотных замен в каркасной области, и имеет до 17 консервативных аминокислотных замен в каркасной области (т. е. вне CDR), и предпочтительно имеет менее десяти, девяти, восьми, семи, шести или пяти консервативных аминокислотных замен в каркасной области, и предпочтительно имеет менее четырех, трех или двух консервативных аминокислотных замен в каркасной области. Другими словами, пембролизумаб и вариант пембролизумаба содержат идентичные последовательности CDR, но которые отличаются друг от друга тем, что имеют консервативную аминокислотную замену не более чем в трех или шести других положениях в своих полноразмерных последовательностях тяжелой и легкой цепи, соответственно. Вариант

пембролизумаба по существу является таким же или превосходит пембролизумаб в отношении следующих свойств: аффинности связывания с PD-1 и нейтрализующего эффекта *in vivo*.

[0126] В некоторых вариантах осуществления обеспечены биоподобные препараты пембролизумаба. Как здесь используется, термин «биоподобный препарат» используется так, что он совпадает с рабочим определением, опубликованным Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, которое определяет биоподобный препарат как препарат, «очень похожий» на референсный продукт (несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах). На практике не должно быть никаких клинически значимых различий между референсным продуктом и биоподобным препаратом в отношении безопасности, чистоты и эффективности (Закон службы здравоохранения (PHS) §262). В некоторых вариантах осуществления проводят двойное слепое перекрестное сравнительное фармакокинетическое (ПК) исследование в однократной дозе для сравнения пембролизумаба с биоподобным антителом–кандидатом для определения сопоставимой биодоступности.

[0127] Как здесь используется, термин «референсный продукт» используется для обозначения коммерчески доступного пембролизумаба.

[0128] Рецептор PD-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 дендритных клеток или макрофагов. PD1 и PD-L1/PD-L2 относятся к семейству белков иммунных контрольных точек, которые функционируют в качестве коингибирующих факторов, которые могут останавливать или ограничивать развитие Т-клеточного ответа. Взаимодействие PD1/PD-L1 гарантирует, что иммунная система активируется только в соответствующее время, чтобы минимизировать возможность развития хронического аутоиммунного воспаления. Когда PD-L1 связывается с PD-1, то в Т-клетку передается ингибирующий сигнал, который снижает продукцию цитокинов и подавляет пролиферацию Т-клеток. Опухолевые клетки используют этот путь иммунных контрольных точек в качестве механизма, позволяющего избежать обнаружения, и ингибировать иммунный ответ.

[0129] PD-L1 обычно сверхэкспрессируется на опухолевых клетках или на нетрансформированных клетках в микроокружении опухоли. PD-L1, экспрессируемый на опухолевых клетках, связывается с рецепторами PD-1 на активированных Т-клетках, что приводит к ингибированию цитотоксических Т-клеток. Такие дезактивированные Т-клетки остаются ингибированными в микроокружении опухоли. Путь PD1/PD-L1 представляет собой механизм адаптивной иммунной резистентности, которая проявляется опухолевыми клетками в ответ на эндогенную противоопухолевую активность.

[0130] Как здесь используется, термин «статус PD-L1» или «статус экспрессии PD-L1» относится к уровню PD-L1, присутствующим в образце, например в образце опухоли. В некоторых вариантах осуществления статус PD-L1 выражается в виде «показателя доли

опухоли» или «TPS», который относится к проценту опухолевых клеток в образце, которые экспрессируют определяемый уровень PD-L1 (см. Garon et al. (2015) NEJM, 372: 2018–28.) Статус PD-L1 является «низкоэкспрессированным» или «пониженным» или «низким», если PD-L1 экспрессируется в 1%–49% опухолевых клеток в образце, т. е. статус PD-L1 составляет примерно 1%–49%. Статус PD-L1 является «негативным», если PD-L1 экспрессируется менее чем примерно в 1% опухолевых клеток в образце, т. е. статус PD-L1 составляет менее примерно 1%. Статус PD-L1 является «высоким», если PD-L1 экспрессируется примерно в 50% или более опухолевых клеток в образце, т. е. статус PD-L1 составляет примерно 50% или более.

[0131] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления низкоэкспрессированный, пониженный или низкий статус PD-L1 составляет ниже чем примерно 50% или составляет примерно 49%, примерно 48%, примерно 47%, примерно 46%, примерно 45%, примерно 44%, примерно 43%, примерно 42%, примерно 41%, примерно 40%, примерно 39%, примерно 38%, примерно 37%, примерно 36%, примерно 35%, примерно 34%, примерно 33%, примерно 32%, примерно 31%, примерно 30%, примерно 29%, примерно 28%, примерно 27%, примерно 26%, примерно 25%, примерно 24%, примерно 23%, примерно 22%, примерно 21%, примерно 20%, примерно 19%, примерно 18%, примерно 17%, примерно 16%, примерно 15%, примерно 14%, примерно 13%, примерно 12%, примерно 11%, примерно 10%, примерно 9%, примерно 8%, примерно 7%, примерно 6%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2% или примерно 1%. В особенно предпочтительных вариантах осуществления низкоэкспрессированный, пониженный или низкий статус PD-L1 составляет примерно 10%, примерно 9%, примерно 8%, примерно 7%, примерно 6%, примерно 5%, примерно 4%, примерно 3%, примерно 2% или примерно 1%. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления состояние пониженной экспрессии, пониженного или низкого уровня PD-L1 составляет примерно от 1% до примерно 10%, примерно от 1% до примерно 9%, примерно от 1% до примерно 8%, примерно от 1% до примерно 7%, от примерно 1% до примерно 6%, от примерно 1% до примерно 5%, от примерно 1% до примерно 4%, от примерно 1% до примерно 3%, от примерно 1% до примерно 2%, от примерно 2% и примерно 6%, примерно от 3% до примерно 7%, примерно от 4% до примерно 8% или примерно от 5% до примерно 9%.

[0132] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления негативный статус PD-L1 составляет ниже чем примерно 1% или составляет примерно 0,9%, примерно 0,8%, примерно 0,7%, примерно 0,6%, примерно 0,5%, примерно 0,4%, примерно 0,3%, примерно 0,2%, примерно 0,1%, примерно 0,05%, примерно 0,01%, примерно 0,005%, примерно 0,001% или примерно 0% (т. е. ни одна из опухолевых клеток не имеет определяемого уровня PD-L1).

[0133] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления высокий статус PD-L1 составляет примерно 50% или более, например, составляет примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно

85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% (т.е. все опухолевые клетки имеют определяемый уровень PD–L1).

[0134] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления экспрессия PD–L1 детектируется с использованием диагностического антитела против человеческого PD–L1 или его антигенсвязывающего фрагмента в анализе ИHC в FFPE или замороженном срезе образца опухолевой ткани, выделенной из организма субъекта. В некоторых вариантах осуществления экспрессию PD–L1 можно оценить в образце (например, в образце опухоли) с использованием иммуногистохимического анализа PD–L1 ИHC 22C3 pharmDx (Dako North America, Carpinteria, CA). (См. Daud A.I., Wolchok J.D., Robert C., Hwu W.J., Weber J.S., Ribas A., Hodi F.S., Joshua A.M., Kefford R., Hersey P., et al. (2016). Programmed Death–Ligand 1 Expression and Response to the Anti–Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 34, 4102–4109). Обычно врач, лечащий субъекта, назначает проведение диагностического теста для определения экспрессии PD–L1 в образце опухолевой ткани, отобранном у пациента до начала лечения пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом и/или талимогеном лагерпарепвеком, но предполагается, что врач может назначить проведение первого или последующих диагностических тестов в любое время после начала лечения, например, после завершения цикла лечения.

[0135] Как здесь используется, термин «первичное антитело пембролизумаб» и «первичное антитело вариант пембролизумаба» относятся к антителу, которое специфически связывается с PD–L1 в срезе ткани, и, как правило, является первым антителом, используемым в анализе ИHC экспрессии PD–L1 в образце опухоли. В одном варианте осуществления первичное антитело является единственным антителом, используемым в анализе ИHC.

[0136] Как здесь используется, «вторичное антитело» относится к антителу, которое специфически связывается с первичным антителом пембролизумабом или первичным антителом вариантом пембролизумаба, тем самым образуя мостик между первичным антителом и реагентом, используемым для последующего детектирования, если таковые имеются. Вторичное антитело обычно является вторым антителом, используемым в анализе ИHC экспрессии PD–L1 в образце опухоли.

[0137] Как здесь используется, термин «пациент» относится к субъекту, имеющему рак, которого лечат комбинацией пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и талимогена лагерпарепвека.

[0138] В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак, который ассоциирован с одним или более из плотности инфильтрации CD8+ Т–клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD–L1, и низкого уровня сигнатуры гена IFN γ , включающий, не ограничиваясь этим, меланому (например,

кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (рецидивирующую или плоскоклеточную карциному головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2+, HER2–(HR+), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы (например, кастрационно–резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[0139] В еще одних вариантах осуществления у пациента имеется рак, который отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти–PD–L1 терапию или анти–PD–1 терапию (например, пембролизумаблм, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), который может быть необязательно ассоциирован с одним или более из плотности инфильтрации CD8+ Т–клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD–L1 и низкого уровня сигнатуры гена IFN γ , включающий, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи, назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода, рак молочной железы (например, ER+/HER2– рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно–кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медиастинальную В–крупноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина) или мезотелиому.

[0140] Как здесь используется, термин «зонд» означает олигонуклеотид, который способен специфически гибридизоваться в жестких условиях гибридизации с транскриптом, экспрессированным геном, представляющим интерес, и в некоторых предпочтительных вариантах осуществления специфически гибридизуется в жестких условиях гибридизации с конкретным транскриптом гена, представляющего интерес.

[0141] Термин «Критерии оценки ответа опухолей на лечение RECIST 1.1», используемый здесь, означает определения, изложенные в публикации Eisenhauer et al., E.A. et al., Eur. J. Cancer, 45: 228–247 (2009) для целевых или нецелевых очагов, что подходит, в зависимости от контекста, в котором измеряется ответ.

[0142] Как здесь используется, «оценка референсной сигнатуры гена IFN γ » означает оценку сигнатуры гена IFN γ , которая была определена для разделения, по меньшей мере, большинства респондеров, по меньшей мере, от большинства нереспондеров в референсной популяции субъектов, которые имеют один и тот же тип опухоли, что и испытуемый субъект, и которых лечили комбинированной терапией

пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом и талимогеном лагерпарепвеком. Предпочтительно, по меньшей мере, 60%, 70%, 80% или 90% респондеров в референсной популяции имели оценку сигнатуры гена IFN γ , которая ниже выбранного референсного балла (например, заранее установленного порога контрольной панели) (т. е. негативная сигнатура гена IFN γ), в то время как сигнатура гена IFN γ , по меньшей мере, для 60%, 70%, 80%, 90% или 95% нереспондеров в референсной популяции будет выше, чем выбранный референсная оценка (т. е. положительная сигнатура гена IFN γ). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления респондеры в референсной популяции определяются как субъекты, которые достигли частичного ответа (PR) или полного ответа (CR), согласно критериями RECIST 1.1, и нереспондеры определяются как не достигшие какого-либо клинического ответа согласно RECIST 1.1.

[0143] «Пациент респондер» применительно к специфическому противоопухолевому ответу на лечение комбинированной терапией, описанной здесь, означает, что пациент проявил противоопухолевый ответ.

[0144] «Образец», когда он относится к опухоли или любому другому биологическому материалу, указанному здесь, означает образец, который был отобран у субъекта.

[0145] Термин «устойчивый ответ» означает устойчивый терапевтический эффект после прекращения лечения терапевтическим агентом или комбинированной терапией, описанной здесь. В некоторых вариантах осуществления устойчивый ответ имеет продолжительность, которая, по меньшей мере, равна продолжительности лечения или, по меньшей мере, в 1,5, 2,0, 2,5 или 3 раза больше, чем продолжительность лечения.

[0146] «Срез ткани» относится к одной части или кусочку образца ткани, например тонкому срезу ткани, вырезанному из образца нормальной ткани или опухоли.

[0147] Как здесь используется, термин «лечить» или «лечение» рака означает введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и талимогена лагерпарепвека и/или другого терапевтического агента субъекту, у которого имеется рак, или у которого диагностирован рак, для достижения, по меньшей мере, одного положительного терапевтического эффекта, например, такого как уменьшение количества злокачественных клеток, уменьшение размера опухоли, уменьшение уровня инфильтрации злокачественных клеток в периферические органы или снижение уровня метастазирования опухоли или роста опухоли. Положительные терапевтические эффекты при раке могут быть оценены несколькими способами (см. W. A. Weber, J. Null. Med., 50: 1S–10S (2009); Eisenhauer et al., выше). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ответ на пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или талимоген лагерпарепвек оценивают с использованием критериев RECIST 1.1. В некоторых вариантах осуществления лечение, достигаемое терапевтически эффективным количеством, представляет собой любое из частичного ответа (PR), полного ответа (CR),

выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS), выживаемости без заболевания (DFS), объективного ответа (OR) или общей выживаемости (OC). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления плотность CD8+ клеток, биомаркер генной сигнатуры и/или низкий или негативный статус PD-L1 по изобретению являются основой для прогнозирования того, может ли субъект с солидной опухолью достичь PR или CR. Режим введения при терапии, описанной здесь, которая эффективна для лечения пациента с раком, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и масса тела пациента, и от способности терапии вызывать противоопухолевый ответ у субъекта. Несмотря на то, что вариант осуществления способа лечения, лекарственные средства и применения по настоящему изобретению могут быть неэффективными для достижения положительного терапевтического эффекта у каждого субъекта, они должны функционировать у статистически значимого числа субъектов, что определяется любым статистическим тестом, известным в данной области техники, таким как t-критерий Стьюдента, χ^2 -критерий, U-критерий Манна и Уитни, критерий Краскала–Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера–Терпстра и критерий Уилкоксона.

[0148] Термин «опухоль», как он применяется по отношению к субъекту, у которого диагностирован или предположительно имеется рак, относится к злокачественному или потенциально злокачественному новообразованию или массе ткани любого размера и включает первичные опухоли и вторичные новообразования. Сольдная опухоль представляет собой аномальный рост или массу ткани, которая обычно не содержит цист или жидких областей. Различные типы солидных опухолей называют по типу клеток, которые их формируют. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкоз (рак крови) обычно не образует солидных опухолей (Национальный институт рака, Словарь онкологических терминов).

[0149] «Опухолевая нагрузка», также называемая «опухолевой массой», относится к общему количеству опухолевого материала, распределенного по всему организму. Опухолевая нагрузка относится к общему количеству злокачественных клеток или к общему размеру опухоли(ей) во всем теле, включая лимфатические узлы и костный мозг. Опухолевую нагрузку можно определить различными методами, известными в данной области, такими как, например, измерение размеров опухоли(ей) при удалении из организма субъекта, например, с использованием штангенциркуля, или в организме с использованием методов визуализации, например, УЗИ, сканирование костей, компьютерная томография (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ).

[0150] Термин «размер опухоли» относится к общему размеру опухоли, который можно измерить как длину и ширину опухоли. Размер опухоли может быть определен различными методами, известными в данной области, такими как, например, измерение размеров опухоли(ей) при удалении из организма субъекта, например, с помощью штангенциркуля, или, находясь в организме, используя методы визуализации, например, сканирование костей, ультразвук, компьютерная томография или МРТ.

[0151] Термин «вариабельные области» или «V-область» в контексте настоящего описания означает участок цепей IgG, который является вариабельным по последовательности между различными антителами. Он простирается до остатка 109 по Kabat в легкой цепи и 113 в тяжелой цепи.

[0152] В некоторых вариантах осуществления способов лечения, лекарственных средств и применений по изобретению, раскрытых здесь, субъект представляет собой человека, и рак коррелирует с низким или негативным статусом PD-L1 и/или низкой или негативной плотностью CD8+ Т-клеток, включая, не ограничиваясь этим: меланому (как правило, высокий уровень инфильтрации Т-клетками, высокий % PD-L1+; субпопуляция PD-L1/TIL низкая, Tumeh et al. *Nature*, 2014; Daud, *JCO*, 2016); немелкоклеточный рак легких (некоторые с высоким % PD-L1+; субпопуляция PD-L1/TIL низкая, Toralian, *NEJM*, 2012; Garon et al., *NEJM*, 2015; Ameratunga, *PlosOne*, 2016); рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи; HPV-положительная карцинома головы и шеи или HPV-негативная карцинома головы и шеи (как правило, высокий % инфильтрации Т-клеток, высокий % PD-L1+; субпопуляция PD-L1/TIL низкая, вероятно, имеет место как для HPV+, так и для HPV- карциномы головы и шеи, Lyford-Pyke, *CanRes.*, 2013; Malm, *Head Neck*, 2015; Mandal et al., *JCI* 2016); колоректальный рак (дефицит системы репарации ошибок репликации CRC/синдром Линча с высокой степенью инфильтрации PD-L1+ TIL; MSI стабильные CRC, как правило, «холодные опухоли», Le et al., *NEJM*, 2015; Maby, *CanRes.*, 2015); HER2+ рак молочной железы (CD8+ высокий (61%) Foxp3 Treg высокий; преобладающий лимфоцитом рак молочной железы (16%), Stanton, *JAMA* (2016)); HER2-(HR+) рак молочной железы (CD8+ средний (43%) низкий Foxp3 Treg; преобладающий лимфоцитом рак молочной железы (6%), Stanton, *JAMA* (2016)); тройной негативный рак молочной железы (CD8+ высокий (60%) высокий Foxp3 Treg; преобладающий лимфоцитом рак молочной железы (20%), Stanton, *JAMA* (2016)); рак яичника (прогностические данные в отношении TIL, примерно сходные с меланомой; частота ответа 15–40% согласно публикациям Hemanishi *JCO*, Hemanishi *JCO*, 2015; Mandai, *IJCO*, 2016); рак мочевого пузыря (корреляция с PD-L1; возможная корреляция рака мочевого пузыря TIL для ингибиторов контрольных точек, Powles, *Nature*, 2014 (Atezo); Kim, *ICU*, 2016); увеальная меланома (данные bmx представлены Piperno-Neumann, *ASCO*, 2016, увеальная меланома); кастрационно-резистентный рак предстательной железы (недостаточность экспрессии PD-L1 при раке предстательной железы: резистентность врожденного и адаптивного иммунитета, Martin *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2015 Kim *ICU* 2016); саркома мягких тканей или кости (средний уровень ответа; доступные данные прогностического анализа PD-L1/TIL необходимо извлечь для поиска клинических данных с TIL против ответа на ингибитор контрольных точек, L. Paoluzzi, *Clinical Sarcoma Research*, 2016; D'Angelo S.P., *Human Pathol* 2015); и почечноклеточный рак (пембролизумаб, в основном используемый в комбинации с RCC: Ipi, акситиниб, анти-VEGF и т. д., как правило, высокий уровень инфильтрации Т-клетками, высокий % PD-

L1+; низкий уровень PD–L1/TIL, Taube, Clin. Can. Res., 2014).

[0153] В еще одних вариантах осуществления способов лечения, лекарственных средств и применений по изобретению, раскрытых здесь, субъект представляет собой человека, и рак коррелирует с низкой или негативной сигнатурой мРНК IFN γ , включая, не ограничиваясь этим: меланому (корреляция ORR/PFS с сигнатурой IFN γ , Ayers et al., JTC, 2015); карциному головы и шеи (сигнатуры «воспаленного фенотипа» являются сильными прогностическими факторами клинической эффективности лечения анти–PD–1 для HNSCC даже среди группы пациентов, которые уже определены как PD–L1+; информация о клинических испытаниях: NCT01848834, Seiwert, ASCO et al. JTC); рак желудка (корреляция PFS с сигнатурой IFN γ , Ayers et al., JTC, 2015); рак пищевода (в целом, у пациентов с более высокими показателями сигнатуры наблюдался более сильный ответ на пембролизумаб и существенные задержки в прогрессировании заболевания; в группе без воспаления с низким показателем, ORR составлял 11% по сравнению с 43% для пациентов с более высоким баллом сигнатуры, Doi et al., GCS, 2016, этот ряд данных профилирования РНК из 5 видов злокачественных опухолей добавляет все больше доказательств того, что инфильтрация опухоли активированными Т–клетками является необходимым условием для ответа на блокаду контрольных точек PD–1, и демонстрирует, что гены сигнатуры экспрессии воспаленных Т–клеток являются предраковыми факторами, определяющими клиническую эффективность анти–PD–1 терапии, Piha–Paul et al., ASCO, 2016); рак анального канала (согласно Piha–Paul et al., ASCO 2016); рак желчевыводящих путей (согласно Piha–Paul et al., ASCO 2016); колоректальный рак (согласно Piha–Paul et al., ASCO 2016); рак яичников (согласно Piha–Paul et al., ASCO 2016); и переходноклеточный рак (сходен с меланомой, SCCHN и раком желудка в отношении прогностической ценности сигнатуры IFN γ).

[0154] В еще одних вариантах осуществления вышеуказанного способа лечения, лекарственных средств и применений субъект представляет собой человека, и рак коррелирует с низкой или негативной экспрессией мРНК PD–L1, включая, не ограничиваясь этим: рак поджелудочной железы (4% PD–L1+, Ayers et al., AACR, 2015); рак предстательной железы (14% PD–L1+, там же); тройной негативный рак молочной железы (29% PD–L1+, там же); меланому (41% PD–L1+, там же); немелкоклеточный рак легкого (42% PD–L1+, там же); уротелиальный рак (42% PD–L1+, там же); и рак головы и шеи (59% PD–L1+, там же) (например, рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи).

Способы, применения и лекарственные средства

[0155] В одном аспекте изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту комбинированной терапии, которая включает пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающие фрагменты и талимоген лагерпарепвек.

[0156] Комбинированная терапия также может включать один или более дополнительных терапевтических агентов. Дополнительным терапевтическим агентом

может быть, например, химиотерапевтический агент, биотерапевтический агент, иммуногенный агент (например, аттенуированные раковые клетки, опухолевые антигены, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, индуцированные опухолевым антигеном или нуклеиновыми кислотами, иммуностимулирующие цитокины (например, IL-2, IFN α 2, GM-CSF) и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины, такие как GM-CSF, не ограничиваясь ими). Конкретная доза и режим введения дополнительного терапевтического агента могут дополнительно различаться, и оптимальная доза, режим дозирования и путь введения будут определяться с учетом конкретного терапевтического агента, который используется.

[0157] Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклосфосамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентеофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, булатацин и булатацинон); камптотecin (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и SWI-TMI); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, оксид гидрохлорид мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183–186 (1994); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат, эсперамицин, а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеины хромомофоров – энедиинового антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутимицин, азазерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как

калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, подавляющие функцию надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазикувон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел и доксетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого агента из вышеперечисленных. Также включены антигормональные агенты, которые действуют для регулирования или ингибирования действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен, ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LYI 17018, онапристон и торемифен (Fareston); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, ацетат мегестрола, экземестан, форместан, фадрозол, ворозол, летрозол и анастрозол; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого агента из вышеперечисленных.

[0158] Каждый терапевтический агент в комбинированной терапии по изобретению можно вводить отдельно или в лекарственном препарате (также называемом здесь фармацевтической композицией), который включает терапевтический агент и один или более фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов и разбавителей, в соответствии со стандартной фармацевтической практикой.

[0159] Каждый терапевтический агент в комбинированной терапии по изобретению можно вводить одновременно (т. е. в одном и том же лекарственном препарате), параллельно (т. е. в отдельных лекарственных препаратах, которые вводят один за другим в любом порядке) или последовательно в любом порядке. Последовательное введение особенно пригодно, когда терапевтические агенты в комбинированной терапии находятся

в разных лекарственных формах (один агент представляет собой таблетку или капсулу, и другой агент представляет стерильную жидкость), и/или вводятся в разных режимах дозирования, например химиотерапевтический агент, который вводят, по меньшей мере, ежедневно, и биотерапевтический агент, который вводят реже, например, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели, и/или вводят в разные области тела, например, один терапевтический агент вводят интратуморально и один терапевтический агент вводится системно.

[0160] В особенно предпочтительных вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят перед введением пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента. В других вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят после введения пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента. В еще одном варианте осуществления талимоген лагерпарепвек вводят одновременно с пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0161] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из терапевтических агентов в комбинированной терапии вводят с использованием одного и того же режима введения (доза, частота введения и продолжительность лечения), который обычно используется, когда этот агент применяется в виде монотерапии для лечения того же типа рака. В еще одних вариантах осуществления пациент получает меньшее общее количество, по меньшей мере, одного из терапевтических агентов в комбинированной терапии, по сравнению, когда агент используется в виде монотерапии, например, в меньших дозах, с меньшей частотой введения и/или с более короткой продолжительностью лечения.

[0162] В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят интратуморально. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентерально.

[0163] Комбинированная терапия по изобретению может использоваться до или после операции по удалению опухоли и может использоваться до, во время или после лучевой терапии.

[0164] В некоторых вариантах осуществления комбинированную терапию по изобретению вводят пациенту, который ранее не подвергался лечению биотерапевтическим или химиотерапевтическим агентом, т. е. является наивным в отношении лечения рака. В еще одних вариантах осуществления комбинированную терапию вводят пациенту, у которого не удалось достичь устойчивого ответа после предшествующей терапии (например, после неудачной или неэффективной терапии с использованием ингибитора контрольных точек (например, анти-PD-L1 или анти-PD-1 терапии) (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)) или химиотерапевтического препарата, т. е. имеется опыт лечения рака.

[0165] Комбинированная терапия по изобретению обычно используется для

лечения опухоли, которая достаточно большая, чтобы ее можно было обнаружить пальпацией или с помощью методов визуализации, хорошо известных в данной области, таких как МРТ, УЗИ или КТ-сканирование.

[0166] Комбинированную терапию по изобретению предпочтительно вводят пациенту-человеку, у которого имеется злокачественная опухоль, которая имеет низкую плотность CD8⁺ Т-клеток, негативную сигнатуру гена IFN γ и/или имеет низкий или негативный статус PD-L1.

[0167] Выбор режима дозирования (также называемого здесь режимом введения) для комбинированной терапии по изобретению зависит от нескольких факторов, включая скорость обновления сыворотки или ткани субъекта, степень выраженности симптомов, иммуногенность препарата и доступность целевых клеток, тканей или органов у человека, которого подвергается лечению. Предпочтительно, режим дозирования максимизирует количество каждого терапевтического агента, доставляемого пациенту, с учетом приемлемого уровня проявления побочных эффектов. Следовательно, количество дозы и частота введения каждого биотерапевтического и химиотерапевтического агента в комбинации частично зависят от конкретного терапевтического агента, тяжести рака, подлежащего лечению, и характеристик пациента. Существуют указания для выбора подходящих доз антител, цитокинов и низкомолекулярных препаратов. См., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601–608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341 : 1966–1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783–792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613–619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24–32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343 : 1594–1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002). Определить подходящий режим дозирования может сделать практикующий врач, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области, которые оказывают влияние на лечение или предположительно оказывают влияние на лечение, и будет зависеть, например, от истории болезни пациента (например, предыдущей терапии), типа и стадии рака, подлежащего лечению, и биомаркеров ответа на один или более терапевтических агентов, входящих в комбинированную терапию. Оптимальная доза для пембролизумаба в сочетании с талимогеном лагерпарепвексом может быть определена посредством повышения дозы или снижения дозы одного или обоих этих агентов.

[0168] Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, которое содержит пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий

фрагмент можно получить в клетках СНО с использованием традиционных технологий культивирования клеток и выделения/очистки.

[0169] В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство, содержащее пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть обеспечено в виде жидкой композиции или приготовлено разведением лиофилизированного порошка стерильной водой для инъекций перед применением. В WO 2012/135408 описано получение жидких и лиофилизированных лекарственных средств, содержащих пембролизумаб, которые подходят для применения в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство, содержащее пембролизумаб, обеспечивается в стеклянной ампуле, которая содержит примерно 100 мг пембролизумаба в 4 мл раствора. В каждом 1 мл раствора содержится 25 мг пембролизумаба, и он формулирован в следующей смеси: L-гистидин (1,55 мг), полисорбат 80 (0,2 мг), сахараза (70 мг) и вода для инъекций, USP. Для в/в инфузии раствор требуется разводить.

[0170] Биотерапевтические агенты в комбинированной терапии по изобретению можно вводить непрерывной инфузией или в дозах с интервалами, например, ежедневно, через день, три раза в неделю или один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в месяц, раз в два месяца и т. д. Общая недельная доза обычно составляет, по меньшей мере, 0,05 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 10 мкг/кг, 100 мкг/кг, 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг массы тела или выше. Смотри, например, Yang et al. (2003) *New Engl. J. Med.*, 349:427–434; Herold et al. (2002) *New Engl. J. Med.*, 346: 1692–1698; Liu et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 67:451–456; Portielji et al. (20003) *Cancer Immunol. Immunother.*, 52: 133–144.

[0171] В некоторых вариантах осуществления, в которых используют пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, режим дозирования будет включать введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе 1, 2, 3, 5 или 10 мг/кг с интервалами примерно 14 дней (± 2 дня) или примерно 21 день (± 2 дня) или примерно 30 дней (± 2 дня) на протяжении всего курса лечения. В предпочтительном варианте осуществления пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в дозе 2 мг/кг один раз в 3 недели (например, для меланомы). В другом предпочтительном варианте осуществления пембролизумаб, вариант пембролизумаба или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в дозе 200 мг (фиксированной) один раз в 3 недели (например, для немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и/или лимфомы Ходжкина).

[0172] В еще одних вариантах осуществления, в которых используют пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент в комбинированной терапии, режим дозирования будет включать введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе примерно от 0,005 мг/кг до примерно 10 мг/кг с повышением дозы для данного

пациента. В еще одних вариантах осуществления с повышением дозы интервал между дозами будет постепенно сокращаться, например, примерно 30 дней (± 2 дня) между первой и второй дозой, примерно 14 дней (± 2 дня) между второй и третьей дозами. В некоторых вариантах осуществления интервал введения будет составлять примерно 14 дней (± 2 дня) для доз, следующих за второй дозой.

[0173] В некоторых вариантах осуществления субъекту проводят парентеральное введение, например, внутривенной (в/в) инфузией лекарственного средства, содержащего любое из пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0174] В предпочтительном варианте осуществления изобретения пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в жидком лекарственном средстве в дозе, выбранной из группы, состоящей из 1 мг/кг раз в две недели (Q2W), 2 мг/кг Q2W, 3 мг/кг Q2W, 5 мг/кг Q2W, 10 мг Q2W, 1 мг/кг раз в три недели (Q3W), 2 мг/кг Q3W, 3 мг/кг Q3W, 5 мг/кг Q3W, 10 мг Q3W и фиксированные эквивалентные по дозе любой из этих доз, т. е. такие как 200 мг Q3W. В некоторых вариантах осуществления пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечен в виде жидкого лекарственного средства, которое включает 25 мг/мл пембролизумаба, 7% (мас./об.) сахарозы, 0,02% (мас./об.) полисорбата 80 в 10 мМ гистидиновом буфере, pH 5,5.

[0175] В некоторых вариантах осуществления выбранную дозу пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента вводят внутривенной инфузией. В одном варианте осуществления выбранную дозу пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента вводят внутривенной инфузией в течение периода времени от 25 до 40 мин или примерно 30 мин.

[0176] Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, которое содержит талимоген лагерпарепвек и фармацевтически приемлемый эксципиент. Талимоген лагерпарепвек может быть суспендирован в физиологическом буфере для интратуморальной инъекции.

[0177] В некоторых вариантах осуществления талимоген лагерпарепвек вводят интратуморальной инъекцией в инъецируемые опухоли в дозе до 4,0 мл с 10^6 бляшкообразующими единицами/мл (БОЕ/мл) на день 1 недели 1 с последующей дозой до 4,0 мл с 10^8 БОЕ/мл на день 1 недели 4 и 6, и затем раз в 2 недели (± 3 суток). Рекомендуемый объем талимогена лагерпарепвека для инъекционного введения в опухоль(и) зависит от размера опухоли и должен определяться в соответствии с рекомендованными объемами для инъекционного введения, приведенными в таблице 1.

[0178]

Таблица 1

Рекомендованные объемы для инъекционного введения талимогена лагерпарепвека с учетом размера опухоли

Размер опухолей (наибольший диаметр)	Максимальный объем для инъекционного введения
$\geq 5,0$ см	4,0 мл
от $>2,5$ см до 5,0 см	2,0 мл
от $>1,5$ см до 2,5 см	1,0 мл
от $>0,5$ см до 1,5 см	0,5 мл
$\leq 0,5$ см	0,1 мл

[0179] Во все обоснованно инъецируемые очаги (кожные, подкожные и узловые новообразования, при которых можно проводить инъекции под контролем ультразвука или без него) инъекции должны проводиться с учетом максимального объема дозирования, доступного в каждом отдельном случае дозирования. На каждый день лечения рекомендуется следующий приоритетный порядок инъекций: любая новая инъецируемая опухоль, появившаяся после последней инъекции; по размеру опухоли, начиная с самой большой опухоли; любая ранее не поддающаяся инъекции опухоль (опухоли), которая в настоящее время является инъецируемой. Композиции могут содержать одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из буфера, антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота, низкомолекулярный полипептид (например, содержащий менее 10 аминокислот), белок, аминокислота, углевод, такой как глюкоза, сахароза или декстрины, хелатирующий агент, такой как ЭДТА, глутатион, стабилизатор и наполнитель. Нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный со специфическим сывороточным альбумином, являются примерами подходящих разбавителей. В соответствии с соответствующими отраслевыми стандартами также могут быть добавлены консерванты, такие как бензиловый спирт. Композиция может быть составлена в виде лиофилизата с использованием подходящих растворов наполнителей (например, сахарозы) в качестве разбавителей. Подходящие компоненты являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

[0180] В некоторых вариантах осуществления пациента выбирают для лечения комбинированной терапией по изобретению, если у пациента имеет место следующее: (1) плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкий или негативный статус PD-L1 и/или негативная сигнатура гена IFN γ ; и (2) была диагностирована меланома (например, кожная, метастатическая, увеальная), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2⁺, HER2[−](HR⁺), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы (например, кастрационно-резистентный), саркома (например, мягких тканей, кости),

почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[0181] В еще одних вариантах осуществления пациента выбирают для лечения комбинированной терапией по изобретению, если у пациента имеет место следующее: (1) рак, который отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)); (2) который может быть необязательно ассоциирован с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и негативной сигнатуры гена IFN γ ; и (3) была диагностирована меланома (например, кожная, метастатическая, увеальная), рак легкого (немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи, назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода), рак молочной железы (например, ER+/HER2-, воспалительный, тройной негативный), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественная миелома, лимфома (например, медистинальная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Ходжкина) или мезотелиома.

[0182] Лекарственные средства, описанные здесь, могут быть обеспечены в виде набора, который содержит первый контейнер и второй контейнер, и вкладыш в упаковку. Первый контейнер содержит, по меньшей мере, одну дозу лекарственного средства, содержащего пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй контейнер содержит, по меньшей мере, одну дозу талимогена лагерпарепвека. Набор может необязательно включать вкладыш в упаковку или этикетку, которые включают инструкции по лечению рака у пациента с использованием лекарственных средств. Первый и второй контейнеры могут иметь одинаковые или разные формы (например, флаконы, шприцы и бутылки) и/или материалы (например, пластик или стекло). Набор может дополнительно содержать другие материалы, которые могут быть пригодны при введении лекарственных средств, такие как разбавители, фильтры, мешки и линии для внутривенного введения, иглы и шприцы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления набора в инструкциях указано, что лекарственные средства предназначены для лечения пациента с раком, который имеет плотность CD8⁺ Т-клеток ниже 1000 клеток/мм², негативную сигнатуру гена IFN γ и/или низкий или негативный статус PD-L1.

Фармацевтические композиции

[0183] Изобретение относится к применению вышеописанных агентов для

профилактического и/или терапевтического лечения, как описано ниже. Следовательно, пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или талимоген лагерпарепвек по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно включают пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, или талимоген лагерпарепвек и фармацевтически приемлемый носитель. Как здесь используется, выражение «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любого и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических и замедляющих всасывание агентов и тому подобное, совместимых с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным соединением, то предполагается их применение в композициях. В композиции также можно включить дополнительные активные соединения.

[0184] Фармацевтическая композиция по изобретению формулирована так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное, трансдермальное (местное) и трансмукозальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно доводить кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с многочисленными дозами, изготовленные из стекла или пластика.

[0185] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (для водорастворимых) или дисперсии и стерильные порошки для восстановления перед применением для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного, IS, ICV и/или IT введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна

быть защищена от нежелательного воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, включающая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, поддержанием необходимого размера частиц в случае дисперсии и применением поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобное. Во многих случаях будет предпочтительно включить в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъектируемых композиций может быть достигнута включением в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[0186] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить включением активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии готовят включением активного соединения 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 предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

[0187] Системное введение может осуществляться трансмукозальным или трансдермальным способом. Для трансмукозального или трансдермального введения в препарате используются пенетранты, соответствующие барьеру, который нужно преодолеть. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансмуккозальное введение может быть достигнуто путем применения назальных спреев или суппозиторий. Для трансдермального введения активные соединения формулируют в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, общеизвестных в данной области.

[0188] В одном варианте осуществления, пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент или талимоген лагерапептэк готовят с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды,

полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов известны специалистам в данной области. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, направленные на инфицированные клетки с использованием моноклональных антител к вирусным антигенам) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

[0189] Особенно преимущественно формулировать композиции для парентерального введения в разовой лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Как здесь используется, разовая лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовых доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для разовых лекарственных форм по изобретению продиктована и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и также от ограничений, имеющих в области составления такого активного соединения для лечения субъектов.

[0190] Фармацевтические композиции можно включить в контейнер, упаковку или дозатор вместе с необязательными инструкциями по введению.

[0191] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить рядом путей в зависимости от того, желательна местная или системная терапия, и от области тела, подлежащей лечению. Введение может быть интратуморальным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное, подкожное, внутрибрюшинное или внутримышечное инъекционное введение, интратекальное или интравентрикулярное введение.

[0192] Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Интравентрикулярную инъекцию можно проводить с использованием внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару. Для внутривенного применения следует контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы препарат был изотоническим.

[0193] Типы фармацевтических эксципиентов, которые можно использовать в качестве носителей, включают стабилизаторы, такие как человеческий сывороточный альбумин (HSA), наполнители, такие как углеводы, аминокислоты и полипептиды; регуляторы pH или буферы; соли, такие как хлорид натрия; и тому подобное. Такие носители могут быть в кристаллической или аморфной форме или могут быть смесью двух.

[0194] Объемообразующие агенты, которые являются особенно ценными,

включают совместимые углеводы, полипептиды, аминокислоты или их комбинации. Подходящие углеводы включают моносахариды, такие как галактоза, D-манноза, сорбоза и тому подобное; дисахариды, такие как лактоза, трегалоза и т.п.; циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин; и полисахариды, такие как рафиноза, мальтодекстрины, декстраны и тому подобное; альдиты, такие как маннит, ксилит и тому подобное. Предпочтительная группа углеводов включает лактозу, трегалозу, рафинозу, мальтодекстрины и маннит. Подходящие полипептиды включают аспартам. Аминокислоты включают аланин и глицин, причем глицин является предпочтительным.

[0195] Подходящие регуляторы pH или буферы включают органические соли, полученные из органических кислот и оснований, такие как цитрат натрия, аскорбат натрия и тому подобное; цитрат натрия является предпочтительным.

[0196] В одном варианте осуществления разовые дозы или измеренные дозы композиции, которая включает пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, или талимоген лагерпарепвек, дозируются с помощью имплантированного устройства. Устройство может включать датчик, который контролирует параметр у субъекта. Например, устройство может включать насос, такой как осмотический насос и, необязательно, связанную электронику.

Тестирование биомаркеров

[0197] Балл оценки экспрессии биомаркера (например, балл оценки сигнатуры гена IFN γ и/или статус PD-L1) можно определить в образце опухолевой ткани, полученной из организма субъекта. Опухоль может быть первичной или рецидивирующей и может представлять любой тип (как описано выше), любую стадию (например, I, II, III или IV стадию или эквивалент другой системы стадирования опухолей), и/или любую гистологию. Субъект может быть любого возраста, пола, с любой историей лечения и/или степенью и продолжительностью ремиссии.

[0198] Образец опухоли можно получить с использованием различных процедур, включая, не ограничиваясь этим, хирургическое иссечение, аспирацию или биопсию. Можно приготовить срез образца ткани и анализировать в виде свежего образца. Альтернативно, образец ткани может быть заморожен для дальнейшего приготовления среза. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления образец ткани сохраняется фиксацией и заливкой в парафин или тому подобное.

[0199] Образец опухолевой ткани можно фиксировать с использованием обычной методологии, где продолжительность фиксации зависит от размера образца ткани и используемого фиксатора. Нейтральный забуференный формалин, глутаровый альдегид, жидкость Буэна и параформальдегид являются неограничивающими примерами фиксаторов. В предпочтительных вариантах осуществления образец ткани фиксируют в формалине. В некоторых вариантах осуществления образец фиксированной ткани также заливают в парафин для приготовления фиксированного в формалине парафинизированного образца ткани (FFPE).

[0200] Как правило, образец ткани фиксируют и дегидратируют пропусканием

через ряд спиртов восходящей концентрации, пропитывают и заливают в парафин или другие среды, используемые для получения срезов, чтобы можно было приготовить срезы образца ткани. Альтернативно, сначала готовят срезы образца опухолевой ткани, и затем отдельные срезы фиксируют.

[0201] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления балл экспрессии биомаркера для опухоли определяют с использованием FFPE срезов ткани толщиной примерно 3–5 мкм, и предпочтительно 4 или 5 мкм, которые помещают на предметное стекло и сушат на предметном стекле микроскопа.

Диагностическое тестирование для оценки балла сигнатуры гена IFN γ и/или статуса PD–L1

[0202] В одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли происходит из злокачественной опухоли, ассоциированной с низким или негативным статусом PD–L1 и/или негативной сигнатурой гена IFN γ , и, необязательно, с плотностью инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2⁺, HER2[–] (HR⁺), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы (например, кастрационно–резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[0203] В еще одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли происходит из злокачественной опухоли, которая отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти–PD–L1 терапию или анти–PD–1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), которая может быть необязательно ассоциирована с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD–L1 и негативной сигнатуры гена IFN γ , включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи, назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода), рак молочной железы (например, ER⁺/HER2[–], воспалительный, тройной негативный), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно–кишечного тракта (например,

гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медистинальную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина) или мезотелиому.

[0204] После того, как подходящий образец опухолевой ткани получен, его можно анализировать для количественного определения уровня экспрессии каждого из генов, которые включают определенную сигнатуру гена $IFN\gamma$, которая должна быть оценена, например, одну или любую комбинацию $IFN\gamma$, $STAT1$, $CCR5$, $CXCL9$, $PRF1$, $HLA-DRA$, $CXCL10$, $CXCL11$, $ID01$ и $GZMA$, или уровней мРНК $PD-L1$. Как здесь используется, выражение «определить уровень экспрессии гена» относится к детектированию и количественной оценке РНК, транскрибированной с этого гена, или белка, транслированного с такой РНК. Термин «РНК-транскрипт» включает мРНК, транскрибированную с гена, и/или ее специфические сплайсированные варианты и/или фрагменты такой мРНК и сплайсированные варианты. В предпочтительных вариантах осуществления транскрипты РНК, экспрессия которых измеряется, представляют транскрипты, показанные на фиг. 11, и/или транскрипты $PD-L1$.

[0205] Специалист в данной области понимает, что для выделения РНК из образца ткани для анализа можно использовать ряд методов. Например, РНК может быть выделена из замороженных образцов ткани гомогенизацией в гуанидине изотиоцианате и экстракцией смесью фенол-хлороформ. Доступны коммерческие наборы для выделения РНК из образцов FFPE.

[0206] Специалистам в данной области также известно несколько методов, пригодных для детектирования и количественного определения уровня транскриптов РНК в выделенных РНК или лизатах цельных клеток. Количественные способы детектирования включают, не ограничиваясь этим, чипы (т. е. микрочипы), количественную ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР), мультиплексные анализы, анализы защиты от нуклеаз и нозерн-блоттинг. Как правило, в таких методах используют меченые зонды, которые комплементарны участку каждого транскрипта, который должен быть детектирован. Зонды для применения в этих способах можно легко сконструировать на основе известных последовательностей генов и транскриптов, экспрессируемых ими. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления зонды предназначены для гибридизации с каждым из транскриптов генных сигнатур, показанных на фиг. 11. Подходящие метки для зондов хорошо известны и включают, например, флуоресцентные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки.

[0207] В некоторых вариантах осуществления в анализе образца опухоли на предмет генной сигнатуры по изобретению используют детектирование и количественное определение уровней РНК в режиме реального времени с использованием амплификации на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA) в комбинации с молекулярными маяками для детектирования молекул. NASBA описана, например, в публикации Compton J., Nature 350 (6313): 91–92 (1991). NASBA представляет одностадийный метод изотермической РНК-специфической амплификации. Как правило,

способ включает следующие стадии: обеспечение РНК–матрицы в реакционной смеси, где первый праймер прикрепляется к ее комплементарному сайту на 3'-конце матрицы; обратная транскриптаза синтезирует противоположную комплементарную цепь ДНК; РНКаза Н разрушает РНК–матрицу (РНКаза Н разрушает РНК только в гибридах РНК–ДНК, но не в одноцепочечной РНК); второй праймер присоединяется к 3'-концу цепи ДНК, и обратная транскриптаза синтезирует вторую цепь ДНК; и РНК–полимераза Т7 связывает двухцепочечную ДНК и продуцирует цепь комплементарной РНК, которую можно вновь использовать на стадии 1, так что реакция является циклической.

[0208] В еще одних вариантах осуществления формат анализа представляет собой формат на основе флэп–эндонуклеазы, такой как анализ Invader™ (Third Wave Technologies). В случае использования метода invader, готовят зонд–захватчик, содержащий последовательность, специфичную для 3'-области к сайту–мишени, и первичный зонд, содержащий последовательность, специфичную для 5'-области к сайту–мишени матрицы, и несвязанную флэп–последовательность. Затем обеспечивают возможность ферменту клевазе функционировать в присутствии этих зондов, молекулы–мишени, а также зонда FRET, содержащего последовательность, комплементарную флэп–последовательности, и аутокомплемментарную последовательность, которая помечена как флуоресцентным красителем, так и гасителем. Когда первичный зонд гибридизуется с матрицей, то 3'-конец зонда–захватчика проникает в сайт–мишень, и эта структура расщепляется под действием клевазы, что приводит к диссоциации флэпа. Флэп связывается с зондом FRET, и часть флуоресцентного красителя расщепляется клевазой, что приводит к эмиссии флуоресценции.

[0209] В еще одних вариантах в формате анализа используется прямой захват мРНК с помощью разветвленной ДНК (QuantiGene™, Panomics) или Hybrid Capture™ (Digene).

[0210] Одним примером технологии микрочипов, подходящей для применения в оценке экспрессии генов в сигнатуре гена IFN γ или оценке экспрессии PD–L1, является технология анализа ArrayPlate™, коммерчески доступная от HTG Molecular, Tucson AZ, и описанная в Martel R.R. et al., Assay and Drug Development Technologies 1 (1): 61–71, 2002. Вкратце, эта технология сочетает анализ защиты от нуклеазы с детектированием микрочипа. Клетки в лунках микропланшета подвергают анализу нуклеазной защиты. Клетки лизируют в присутствии зондов, которые связываются с молекулами мРНК–мишени. При добавлении нуклеазы S1 избыток зондов и негибридизованная мРНК разрушаются, так что остаются только дуплексы мРНК:зонд. Щелочной гидролиз разрушает мРНК–компонент дуплексов, оставляя зонды интактными. После добавления раствора для нейтрализации содержимое обработанного планшета для культивирования клеток переносят в другой планшет ArrayPlate™, называемый программированным ArrayPlate™. ArrayPlates™ содержит чип из 16 элементов на дне каждой лунки. Каждый элемент чипа содержит положение–специфический якорный олигонуклеотид, который остается одним и тем же от одного анализа к другому. Специфичность связывания

каждого из 16 якорей модифицируется олигонуклеотидом, называемым программным линкерным олигонуклеотидом, который на одном конце комплементарен якорю, и на другом конце – зонду в анализе защиты от нуклеазы. Во время реакции гибридизации зонды, перенесенные из культурального планшета, захватываются иммобилизованным программным линкером. Захваченные зонды метят посредством гибридизации с олигонуклеотидом–линкером для детектирования, который, в свою очередь, метят конъюгатом для детектирования, который включает пероксидазу. Фермент поставляется с хемилюминесцентным субстратом, и генерированный в результате ферментативной реакции свет фиксируется на цифровом изображении. Интенсивность света в элементе чипа является показателем количества соответствующей мРНК–мишени, присутствующей в исходных клетках.

[0211] В качестве дополнительного примера, для измерения экспрессии генов можно использовать ДНК–микрочипы. Вкратце, ДНК–микрочип, также относящийся здесь ДНК–чипу, представляет собой микроскопическую матрицу фрагментов ДНК, таких как синтетические олигонуклеотиды, расположенные по определенной схеме на твердой подложке, где они поддаются анализу стандартными методами гибридизации (см. Schena, *BioEssays*, 18: 427 (1996)). Типичные микрочипы и способы их изготовления и применения описаны в публикации T.R. Hughes et al., *Nature Biotechnology*, 9: 342–347 (2001). Специалистам в данной области известен ряд различных конфигураций микрочипов и способов их получения, которые раскрыты в патентах США № 5242994; 5384261; 5405783; 5412087; 5424186; 5429807; 5436327; 5445934; 5556752; 5405783; 5412087; 5424186; 5429807; 5436327; 5472672; 5527681; 5529756; 5545531; 5554501; 5561071; 5571639; 5593839; 5624711; 5700637; 5744305; 5770456; 5770722; 5837832; 5856101; 5874219; 5885837; 5919523; 6022963; 6077674 и 6156501; Shena, et al., *Tibtech.*, 6:301–306, 1998; Duggan et al., *Nat. Genet.*, 2:10–14, 1999; Bowtell et al., *Nat. Genet.*, 21:25–32, 1999; Lipshutz et al., *Nat. Genet.*, 21:20–24, 1999; Blanchard et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 77:687–90, 1996; Maskos et al., *Nucleic Acids Res.* 2:4663–69, 1993; and Hughes et al., *Nat. Biotechnol.*, 79:342–347, 2001. Патенты, описывающие способы использования чипов в различных применениях, включают: патенты США № 5143854; 5288644; 5324633; 5432049; 5470710; 5492806; 5503980; 5510270; 5525464; 5547839; 5580732; 5661028; 5848659; и 5874219; раскрытие которых включено здесь посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

[0212] В одном варианте осуществления микрочип на основе олигонуклеотидов может быть синтезирован на твердой подложке. Типичные твердые подложки включают стекло, пластмассы, полимеры, металлы, полуметаллы, керамику, органику и т. д. Используя технологии маскировки чипов и фотозащитную химию, можно генерировать упорядоченные матрицы нуклеиновокислотных зондов. Эти матрицы, которые известны, например, как «ДНК–чипы» или полимерные матрицы с высокомасштабной иммобилизацией (чипы «VLSIPS[®]»), могут включать миллионы определенных областей зондов на подложке, имеющей площадь примерно от 1 см² до нескольких см², тем самым

включая от нескольких до миллионов зондов (см., например, патент США № 5631734).

[0213] Для сравнения уровней экспрессии меченые нуклеиновые кислоты можно подвергнуть контактированию с микрочипом в условиях, достаточных для связывания нуклеиновой кислоты–мишени и зонда на чипе. В одном варианте осуществления условия гибридизации могут быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить желаемый уровень специфичности гибридизации; т. е. условия, достаточные для того, чтобы имела место гибридизация между мечеными нуклеиновыми кислотами и зондами на микрочипе.

[0214] Гибридизация можно проводить в условиях, обеспечивающих по существу специфическую гибридизацию. Длина и содержание GC нуклеиновой кислоты будут определять температуру термического плавления и, следовательно, условия гибридизации, необходимые для обеспечения специфической гибридизации зонда с нуклеиновой кислотой–мишенью. Такие факторы хорошо известны специалистам в данной области техники, и также могут быть проверены в анализах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в публикации Tijssen, et al. (*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: *Hybridization With Nucleic Acid Probes*, P. Tijssen, ed.; Elsevier, N.Y. (1993)). Способы, описанные выше, приведут к получению паттернов гибридизации меченых нуклеиновых кислот–мишеней на поверхности чипа. Полученные в результате паттерны гибридизации меченых нуклеиновых кислот можно визуализировать или детектировать различными способами, где конкретный способ детектирования выбирается с учетом конкретной метки нуклеиновой кислоты–мишени. Типичные методы детектирования включают сцинтилляцию, автордиографию, измерение флуоресценции, калориметрический анализ, измерение светового излучения, рассеяние света и тому подобное.

[0215] В одном из таких способов детектирования используется сканер для считывания микрочипов, который является коммерчески доступным (Affymetrix, Santa Clara, CA), например, сканер 417® Arrayer, 418® Array или сканер Agilent Gene Array®. Такой сканер управляется с помощью системного компьютера с интерфейсом и простыми в использовании программными средствами. Выходной сигнал может быть напрямую импортирован или непосредственно считан различными программными приложениями. Примерные сканирующие устройства описаны, например, в патентах США № 5143854 и 5424186.

[0216] Предпочтительный метод анализа для измерения количества транскриптов биомаркеров включает использование системы анализа nCounter®, коммерчески доступной от NanoString® Technologies (Seattle, Вашингтон, США). В этой системе, которая описана Geiss et al., *Nature Biotechnol.*, 2 (3): 317–325 (2008), используется пара зондов, а именно захватывающий зонд и репортерный зонд, каждый из которых содержит последовательность из 35–50 оснований, комплементарную транскрипту, который подлежит детектированию. Захватывающий зонд дополнительно включает короткую общую последовательность, связанную с меткой для иммобилизации, например, аффинную метку, позволяющую иммобилизовать комплекс для сбора данных.

Репортерный зонд дополнительно содержит детектируемый сигнал или метку, например, связанный с меткой, кодированной цветом. После гибридизации избыток зондов удаляют из образца, и гибридизированные комплексы зонд/мишень выравнивают и иммобилизуют через аффинную или другую метку в картридже. Затем образцы анализируют, например, с использованием цифрового анализатора или другого процессора, адаптированного для этой цели. Как правило, метка, кодированная цветом в каждом транскрипте, подсчитывается и табулируется для каждого целевого транскрипта, с получением уровня экспрессии каждого транскрипта в образце. Эта система позволяет измерять экспрессию сотен уникальных транскриптов генов в одном мультиплексном анализе с использованием захватывающего зонда и репортерного зонда, разработанных Nano-String.

[0217] При измерении экспрессии генов в сигнатуре гена IFN γ или для определения статуса PD-L1, описанного здесь, абсолютную экспрессию каждого из генов в образце опухоли сравнивают с контролем. Например, контролем может быть средний уровень экспрессии каждого из генов соответственно в пуле субъектов. Однако для повышения чувствительности сравнения, значения уровня экспрессии предпочтительно преобразуют несколькими способами.

[0218] Например, уровень экспрессии каждого гена в сигнатуре генов можно нормализовать к среднему уровню экспрессии всех генов или общему уровню экспрессии всех генов, уровень экспрессии которых определяется, или к среднему уровню экспрессии набора контрольных генов. Таким образом, в одном варианте осуществления гены представлены набором зондов, и уровень экспрессии каждого из генов нормализуется к среднему или медианному уровню экспрессии по всем представленным генам, включая любые гены, которые не являются частью генной сигнатуры, представляющей интерес. В конкретном варианте осуществления нормализацию проводят делением медианного или среднего уровня экспрессии всех генов на микрочипе. В другом варианте осуществления уровни экспрессии сигнатурных генов нормализуют к среднему или медианному уровню экспрессии набора контрольных генов. В конкретном варианте осуществления контрольные гены включают гены домашнего хозяйства. В еще одном конкретном варианте осуществления нормализация осуществляется делением на медианный или средний уровень экспрессии контрольных генов.

[0219] Чувствительность оценки генной сигнатуры также будет выше, если сравнить уровни экспрессии отдельных генов в сигнатуре генов с экспрессией тех же генов в пуле опухолевых образцов. Предпочтительно сравнение проводят со средним или медианным уровнем экспрессии каждого сигнатурного гена в пуле образцов. Такое сравнение можно выполнить, например, делением среднего или медианного уровня экспрессии пула для каждого из генов на уровень экспрессии каждого из генов в конкретном образце субъекта, представляющего интерес. Это имеет эффект усиления относительных различий в экспрессии между генами в образце и генами в пуле в целом, делая сравнения более чувствительными и с большей вероятностью дает значимые результаты, чем использование одних только абсолютных уровней экспрессии. Данные по

уровнем экспрессии можно преобразовать любым удобным способом. Предпочтительно, чтобы данные по уровням экспрессии для всего подвергали логарифмическому преобразованию, прежде чем будут приняты средние или медианные значения.

[0220] При выполнении сравнений с пулом можно использовать два подхода. Во-первых, уровни экспрессии сигнатурных генов в образце можно сравнить с уровнем экспрессии этих генов в пуле, где нуклеиновая кислота, полученная из образца, и нуклеиновая кислота, полученная из пула, гибридизуются в ходе одного эксперимента. Для такого подхода требуется создание нового пула нуклеиновой кислоты для каждого сравнения или ограниченного числа сравнений, и поэтому он ограничивается количеством доступной нуклеиновой кислоты. Альтернативно и предпочтительно уровни экспрессии в пуле, будь то нормализованные и/или преобразованные или нет, сохраняются в компьютере или на машиночитаемом носителе для использования при сравнении с отдельными данными уровня экспрессии из выборки (т.е. одноканальные данные).

[0221] При сравнении образца опухоли субъекта со стандартом или контролем значение экспрессии определенного гена в образце сравнивают со значением экспрессии этого гена в стандарте или контроле. Для каждого гена в сигнатуре генов по изобретению создается $\log_{10}$ отношение для значения экспрессии в отдельном образце относительно стандарта или контроля. Оценка для сигнатуры гена IFN γ или экспрессии PD-L1 рассчитывается определением среднего $\log(10)$ соотношения генов в сигнатуре. Если оценка сигнатур генов для тестируемого образца превышает заранее установленный порог для этой сигнатуры генов, то образец считается положительным на биомаркер сигнатуры гена IFN γ . В одном варианте осуществления изобретения заранее установленный порог установлен на любом числе от 2,17 до 2,69 (т.е. 2,18, 2,19, 2,20, 2,66, 2,67, 2,68). Заранее установленный порог может также представлять собой среднее значение, медиану или процентиль баллов для этой генной сигнатуры в коллекции образцов или объединенном образце, используемом в качестве стандарта или контроля.

[0222] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что другие значения дифференциальной экспрессии, помимо $\log(10)$ отношения, можно использовать для вычисления балла сигнатуры, если значение представляет собой объективное измерение количества транскриптов генов. Примеры включают, не ограничиваясь этим: x_{dev} , взвешенную логарифмическую ошибку (отношение) и среднее вычитаемое логарифмическое значение (интенсивность).

[0223] В одном предпочтительном варианте осуществления необработанные значения экспрессии нормализуют путем выполнения квантильной нормализации относительно референсного распределения и последующего $\log_{10}$ преобразования. Когда экспрессия гена детектируется с использованием аналитической системы nCounter®, коммерчески доступной от NanoString®, NanoString Technologies, то референсное распределение генерируется объединением зарегистрированных (т.е. необработанных) значений для испытуемого образца и одного или более контрольных образцов (предпочтительно, по меньшей мере, 2 образца более предпочтительно, по меньшей

мере, любого количества из 4, 8 или 16 образцов) после исключения значений для технических (как положительного, так и отрицательного контроля) зондов и без выполнения промежуточной нормализации, полагаясь на отрицательные (с поправкой на фон) или положительные (синтетические последовательности с добавлением известных титрований). Затем рассчитывают баллы сигнатуры IFN γ в виде среднего арифметического нормализованных значений для каждого из генов в сигнатуре генов, например, одной или любой комбинации STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1 и HLA-DRA или каждого из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, ID01 и GZMA или PD-L1.

[0224] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления референсное распределение генерируется на основе необработанных данных экспрессии для набора нормализации генов, который состоит по существу из каждого из генов в наборе из 400 генов, показанных на фиг. 11, или его поднабора. Подмножество может состоять, по меньшей мере, из любого из 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 или любого целого числа от 25 до 400.

[0225] Каждая из стадий получения образца ткани, приготовления одного или более срезов ткани для анализа биомаркера генной сигнатуры, проведения анализа и оценки результатов может выполняться отдельными лицами/субъектами в разных местах. Например, хирург может выполнить биопсию и получить образец ткани из опухоли больного раком и затем отправить образец ткани в патологоанатомическую лабораторию, в которой может быть проведена фиксация образца ткани и затем приготовление одного или более микроскопических препаратов, каждый с одним срезом ткани, для анализа. Микроскопический препарат(ы) можно анализировать вскоре после приготовления или хранить для последующего анализа. Лаборатория, которая приготовила срез ткани, может провести анализ или отправить микроскопический препарат(ы) в другую лабораторию для проведения анализа. Патологоанатом или квалифицированный специалист, который оценивает микроскопические препараты в отношении генной сигнатуры IFN γ , может работать в диагностической лаборатории или может быть независимым исполнителем по контракту. Альтернативно, одна диагностическая лаборатория получает образец ткани от лечащего врача или хирурга субъекта, и затем выполняет все стадии, включающие приготовление срезов ткани, анализ микроскопического препарата(ов) и вычисление балла сигнатур генов для среза(ов) ткани.

[0226] В некоторых вариантах осуществления субъекты, участвующие в приготовлении и анализе среза ткани на биомаркер генной сигнатуры, не осведомлены об идентичности субъекта, образец которого тестируется; т. е. образец, полученный лабораторией, каким-то образом делают анонимным перед отправкой в лабораторию. Например, образец можно просто идентифицировать по номеру или некоторому другому коду («идентификатору образца»), и результаты анализа сообщаются стороне, заказывающей анализ, используя идентификатор образца. В предпочтительных вариантах осуществления связь между идентичностью субъекта и образцом ткани субъекта известна

только субъекту или лечащему врачу субъекта.

[0227] В некоторых вариантах осуществления после того, как были получены результаты испытания, диагностическая лаборатория готовит протокол испытания, который может содержать любой один или оба из следующих результатов: образец ткани был положительным или отрицательным на биомаркер, балл оценки генной сигнатуры для образца опухоли и референсный балл для этой генной сигнатуры. Протокол испытания может также включать список генов, экспрессия которых была анализирована в анализе.

[0228] В еще одних вариантах протокол испытания может также включать указание о том, как интерпретировать результаты для прогнозирования того, может ли субъект отвечать на комбинированную терапию пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом/талимогеном лагерпарепвеком. Например, в одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли происходит из злокачественной опухоли, включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2+, HER2– (HR+), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы (например, кастрационно–резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы, и имеет негативную оценку сигнатуры гена IFN γ и/или низкую или негативную оценку статуса PD–L1, то в протоколе испытания может быть указано, что у субъекта имеется оценка, ассоциированная с ответом или лучшим ответом на лечение комбинированной терапией пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом/ талимогеном лагерпарепвеком, в то время, как если оценка плотности CD8+ T–клеток и/или оценка сигнатуры гена IFN γ превышают пороговое значение, и/или оценка статуса PD–L1 является высокой, то тогда в протоколе испытания указывается, что пациент имеет оценку, ассоциированную с отсутствием ответа или слабым ответом на лечение комбинированной терапией пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом/ талимогеном лагерпарепвеком.

[0229] В еще одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли происходит из злокачественной опухоли, которая отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти–PD–L1 терапию или анти–PD–1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), которая может быть необязательно ассоциирована с одним или более из плотности инфильтрации CD8+ T–клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл

образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и негативной сигнатуры гена IFN γ , включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи, назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода), рак молочной железы (например, ER+/HER2-, воспалительный, тройной негативный), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медистинальную В-клеточную лимфому из крупных клеток, лимфому Ходжкина) или мезотелиому.

[0230] В некоторых вариантах протокол испытания представляет собой письменный документ, подготовленный диагностической лабораторией и отправленный пациенту или лечащему врачу пациента в виде бумажной копии или по электронной почте. В еще одних вариантах осуществления протокол испытания генерируется компьютерной программой и отображается на видеомониторе в кабинете врача. Протокол испытания также может включать устную передачу результатов испытания непосредственно пациенту, лечащему врачу пациента или уполномоченному сотруднику в кабинете врача. Аналогичным образом, протокол испытания может содержать запись результатов анализа, которую врач делает в файле пациента.

[0231] Детектирование наличия или отсутствия маркера по изобретению может быть выполнено с использованием набора, который был специально разработан для этой цели. В одном варианте осуществления набор содержит ряд олигонуклеотидных зондов, способных гибридизоваться с транскриптами-мишенями в сигнатуре генов. Набор может дополнительно содержать олигонуклеотидные зонды, способные детектировать транскрипты других генов, таких как контрольные гены, или гены, используемые для целей нормализации. Набор олигонуклеотидных зондов может содержать упорядоченную матрицу олигонуклеотидов на твердой поверхности, такой как микрочип, кварцевые шарики (такие как технология BeadArray от Illumina, Сан-Диего, Калифорния) или предметное стекло (см., например, WO 98/20020 и WO 98/20019). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидные зонды обеспечиваются в одной или более композициях в жидкой или сухой форме.

Иммуногистохимия (ИНС)

[0232] Анализ ИНС обычно начинается с извлечения антигена, которое может варьироваться с точки зрения реагентов и способов. Процесс извлечения антигена может включать обработку под давлением, обработку протеазой, обработку микроволнами или нагревание гистологических срезов в ванночках с соответствующими буферами со стандартной целью демаскирования скрытых антигенов, посредством сшивок формалином или другой фиксацией (см., например, Leong et al. *Appl. Immunohistochem.*, 4 (3): 201 (1996)).

[0233] Можно использовать два основных метода ИНС: прямой и опосредованный анализы. В прямом анализе ИНС связывание антитела с антигеном–мишенью определяют непосредственно. В таком прямом анализе используется меченый реагент, такой как флуоресцентная метка или ферментативно меченное первичное антитело, которое можно визуализировать без дальнейшего взаимодействия с антителом. В типичном непрямом анализе неконъюгированное первичное антитело связывается с антигеном, и затем меченное вторичное антитело связывается с первичным антителом. Когда вторичное антитело конъюгировано с ферментативной меткой, то добавляют хромогенный или флуорогенный субстрат для визуализации антигена. Усиление сигнала происходит потому, что несколько вторичных антител могут реагировать с различными эпитопами на первичном антителе.

[0234] Первичное и/или вторичное антитело, используемое для иммуногистохимии, обычно метят детектируемым соединением. Доступны многочисленные метки, которые в общем можно сгруппировать в следующие категории: (а) радиоизотопы, такие как ^{35}S , ^{14}C , ^{131}I , ^3H и ^{123}I (антитело может быть помечено радиоизотопом с использованием методов, описанных в *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1 и 2, Coligen et al., Ed. Wiley–Interscience, New York, NY, Pubs. (1991), и радиоактивность можно измерить с использованием сцинтилляционного счетчика. Другие радионуклиды включают ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{32}P , ^{13}N , ^{18}F , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{225}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th , ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr , ^{82}Rb , ^{201}Th , ^{92}Sr , ^{67}Ga , ^{192}Ir , ^{166}Ho , ^{10}B , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{42}K , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{75}Se , ^{24}Na , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{57}Co , ^{67}Ga , ^{177}Lu и ^{56}Fe); частицы коллоидного золота; и флуоресцентные или хемилюминесцентные метки, включая, не ограничиваясь этим, хелаты редкоземельных элементов (хелаты европия), флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, изотиоцианат, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о–фталадегид, флуорескамин, дансил, умбеллиферон, люциферин, метку люминолом, метку изолюминолом, метку ароматическим сложным эфиром акридиния, метку имидазолом, метку солью акридиния, метку оксалатным эфиром, метку экворином, 2,3–дигидрофталазиндионы, тexasский красный, дансил, лиссамин, умбеллиферон, фитокритерин, фикоциан или коммерчески доступные флуорофоры, такие как SPECTRUM ORANGE® и SPECTRUM GREEN® и/или производные любого одного или нескольких из вышеуказанных соединений. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом, используя, например, методы, раскрытые в *Current Protocols in Immunology*, выше. Флуоресценцию можно определить количественно с помощью флуориметра.

[0235] Доступны различные метки фермент–субстрат (см. патент США № 4275149). Фермент обычно катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое может быть измерено с использованием различных методов. Например, фермент может катализировать изменение цвета субстрата, которое может быть измерено спектрофотометрически. Альтернативно, фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методы количественного определения изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат становится электронно

возбужденным в результате химической реакции и затем может излучать свет, который можно измерить (например, с помощью хемилюминометра), или передает энергию флуоресцентному акцептору.

[0236] Примеры ферментативных меток включают люциферазы (например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу; патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRPO), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы (например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу), гетероциклические оксидазы (такие как уриказа и ксантиноксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и тому подобное. Способы конъюгирования ферментов с антителами описаны в O'Sullivan et al., O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme–Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (ed. J. Langbne & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147–166 (1981).

[0237] Для специалистов в данной области доступны многочисленные комбинации фермент–субстрат. Общий обзор по ним см. в патентах США № 4275149 и 4318980. Примерами комбинаций фермент–субстрат являются: (i) пероксидаза хрена (HRP) с пероксидом водорода в качестве субстрата, где пероксид водорода окисляет краситель–предшественник, например, такой как 3,3'-диаминобензидин (DAB), который дает коричневый конечный продукт; 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), который при окислении образует конечный продукт розово-красного цвета; 4-хлор-1-нафтол (CN), который осаждается в виде синего конечного продукта; и п-фенилендиамин дигидрохлорид/пирокатекол, который образует сине-черный продукт; ортофенилендиамин (OPD) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин гидрохлорид (TMB); (ii) щелочная фосфатаза (AP) и п-нитрофенилфосфат, нафтол AS-MX фосфат, Fast Red TR и Fast Blue BB, нафтол AS-BI фосфат, нафтол AS-TR фосфат, 5-бром-4-хлор-3-индоксилфосфат (BCIP), Fast Red LB, Fast Garnet GBC, нитросиний тетразолий (NBT) и йодонитротетразолий фиолетовый (INT); и (iii) β -D-галактозидаза (β -D-Gal) с хромогенным субстратом (например, п-нитрофенил-п-D-галактозидазой) или флуорогенным субстратом (например, 4-метилумбеллиферил-п-D-галактозидазой).

[0238] Можно использовать любой известный в данной области способ конъюгирования молекул антител с различными молекулами, включая способы, описанные Hunter et al. (1962) *Nature*, 144: 945; David et al. (1974) *Biochemistry*, 13: 1014; Pain et al., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40: 219; и Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.*, 30: 407.

[0239] В некоторых вариантах осуществления метка опосредованно конъюгирована с антителом. Специалист в данной области техники знает о различных методах достижения этого. Например, антитело может быть конъюгировано с биотином, и любая из четырех широких категорий меток, указанных выше, может быть конъюгирована с авидином или наоборот. Биотин селективно связывается с авидином, и, таким образом,

метка может быть конъюгирована с антителом таким опосредованным образом. Альтернативно, для достижения опосредованного конъюгирования метки с антителом антитело конъюгируют с небольшим гаптенем, и одну из различных типов меток, указанных выше, конъюгируют с антителом против гаптена. Таким образом, может быть достигнуто опосредованное конъюгирование метки с антителом.

[0240] После извлечения антигена и необязательной стадии блокирования среза ткани подвергают воздействию пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента в качестве первичного антитела в течение достаточного периода времени и в подходящих условиях, позволяющих первичному антителу связаться с белком PD-L1 в срезе ткани. Соответствующие условия для достижения этого можно определить обычным экспериментированием. Затем микроскопический препарат промывают для удаления несвязанных и избыточных количеств первичного антитела.

[0241] В некоторых вариантах осуществления первичное антитело связано с детектируемой меткой, такой как парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы и тому подобное, и микроскопический препарат оценивается на окрашивание на PD-L1 с использованием соответствующего устройства для визуализации.

[0242] В еще одних вариантах осуществления иммунные комплексы между PD-L1 и первичным антителом могут быть детектированы с использованием второго связывающего агента, который связан с детектируемой меткой. Вторым связывающим агентом предпочтительно является вторичное антитело, которое наносят на предметное стекло в концентрации и в течение периода времени, достаточного для образования вторичных иммунных комплексов. Затем предметное стекло обычно промывают для удаления любого неспецифически связанного вторичного антитела, и детектируют метку во вторичных иммунных комплексах.

[0243] Вторичное антитело может быть помечено с использованием авидина, стрептавидина или биотина, которые независимо метят детектируемой молекулой, такой как флуоресцентный краситель (краситель), люминесцентный краситель или нефлуоресцентный краситель. В принципе, можно использовать любой фермент, который можно конъюгировать или можно опосредованно связать с вторичным антителом (например, через конъюгированный авидин, стрептавидин, биотин). Используемым ферментом может быть, например, щелочная фосфатаза (AP), пероксидаза хрена (HRP), бета-галактозидаза и/или глюкозооксидаза. Фермент также может быть направлен на катализ реакции люминесценции субстрата, такой как, не ограничиваясь этим, люцифераза и акворин, имеющий практически нерастворимый продукт реакции, способный люминесцировать или направлять вторую реакцию второго субстрата, такого как, не ограничиваясь этим, люциферин и АТФ или коэлектронтеразин и Ca^{2+} , имеющие люминесцентный продукт. Наконец, используется реагент для детектирования, который включает хромоген или флуоресцентно меченую молекулу для визуализации локализации иммунных комплексов.

[0244] Анализ ИНС может быть выполнен с использованием автоматизированной системы оценки патологии, которая может включать автоматическое окрашивание (обычные красители, гистохимические методики, иммунокрасители); автоматизированные системы гибридизации *in situ*; автоматическую подготовку стекол (покровное стекло, сушка стекол) и интегрированную маркировку стекол и кассет, как описано Roja et al., *Pathology daily practice, Folia Histochemica et Cytobiologica*, Vol. 47, No. 3, 349–354, 2009.

[0245] В некоторых примерных вариантах осуществления в анализе ИНС используется коммерчески доступная система детектирования Dako EnVision™ FLEX, которая предназначена для использования вместе с прибором Dako Autostainer (Dako, компания Agilent Technologies, Glostrup, Дания). Эти реагенты можно использовать в виде коммерчески доступных для других автостейнеров или для окрашивания, выполняемого вручную (не выполняется с автоконтейнером).

Сбор образцов и приготовление срезов тканей

[0246] Образец опухолевой ткани, используемый для приготовления окрашенных срезов ткани для последующей оценки экспрессии PD–L1, может быть отобран у субъекта до и/или после воздействия на субъект одним или более терапевтических агентов, например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом, талимогеном лагепарепвеком и/или химиотерапевтическим агентом. Следовательно, образцы опухоли могут быть отобраны у субъекта в течение определенного периода времени. Образец опухоли можно получить различными процедурами, включая, не ограничиваясь этим, хирургическое иссечение, аспирацию или биопсию. Из образца ткани можно приготовить срез и исследовать на PD–L1 в виде свежего образца. В других вариантах осуществления образец ткани замораживают для дальнейшего приготовления среза. В еще одних вариантах осуществления образец ткани сохраняется фиксацией и заливкой в парафин или тому подобное.

[0247] Образец ткани можно фиксировать по традиционной методике, где продолжительность фиксации зависит от размера образца ткани и используемого фиксатора. Нейтральный забуференный формалин, глутаральдегид, жидкость Буэна или параформальдегид являются неограничивающими примерами фиксаторов. В предпочтительных вариантах осуществления образец ткани фиксируют в формалине. В некоторых вариантах осуществления образец фиксированной ткани также помещают в парафин для приготовления фиксированного в формалине парафинизированного (FFPE) тканевого образца. Примеры парафина включают, не ограничиваясь этим, Paraplast, Broloid и Tissuemay.

[0248] Как правило, образец ткани фиксируют и дегидратируют с помощью ряда спиртов восходящей концентрации, пропитывают и заливают в парафин или другие среды, используемые для приготовления срезов, так что можно приготовить срез образца ткани. Альтернативно, сначала готовят срез образца опухолевой ткани, и затем фиксируют отдельные участки.

[0249] В некоторых вариантах осуществления процесс оценки по изобретению

осуществляют на срезах образцов FFPE размером примерно 3–4 мм, и предпочтительно 4 мкм, которые помещают на предметное стекло и сушат на предметном стекле микроскопа.

Антитела пембролизумаб и вариант пембролизумаба

[0250] Первичным антителом для анализа ИНС, описанным здесь, является пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются со зрелой формой PD–L1 (в котором отсутствует пресекреторная лидерная последовательность, также упоминаемая как лидерный пептид), которая экспрессируется на поверхности определенных клеток млекопитающих. Термины «PD–L1» и «зрелый PD–L1» используются здесь взаимозаменяемо и должны пониматься как означающие одну и ту же молекулу, если не указано иное или не очевидно из контекста. Как здесь используется, антитело против человеческого PD–L1 или антитело против hPD–L1 относится к антителу, которое специфически связывается со зрелым PD–L1 человека, например, пембролизумаб, вариант пембролизумаба и/или его антигенсвязывающий фрагмент. Зрелая человеческая молекула PD–L1 состоит из аминокислот 19–290 следующей последовательности:

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI
VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY
RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSD
HQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPPLA
HPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
(SEQ ID NO:11).

[0251] Антитело, которое «специфически связывается с человеческим PD–L1», или антитело, которое «специфически связывается с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность человеческого PD–L1», представляет собой антитело, которое проявляет преимущественное связывание с человеческим PD–L1 по сравнению с другими антигенами, но для этой специфичности не требуется абсолютная специфичность связывания. Антитело против hPD–L1 считается «специфичным» для человеческого PD–L1, если его связывание является определяющим для присутствия человеческого PD–L1 в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные результаты в диагностическом анализе ИНС. Антитела или их связывающие фрагменты, используемые в качестве первичных антител в процессах и способах по настоящему изобретению, будут связываться с человеческим PD–L1 с аффинностью, которая, по меньшей мере, в два раза выше, предпочтительно, по меньшей мере, в десять раз выше, более предпочтительно, по меньшей мере, в 20 раз выше, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, в 100 раз выше, чем аффинность связывания с любым другим белком, отличным от PD–L1. Как здесь используется выражение, что антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим данную последовательность, например зрелым человеческим PD–L1, если оно связывается с полипептидами, содержащими эту последовательность, но не связывается с белками, не содержащими эту последовательность. Срезы тканей образцов опухолей от

людей можно оценивать на экспрессию PD-L1 с использованием пембролизумаба, варианта пембролизумаба и/или его антигенсвязывающего фрагмента.

Диагностическое тестирование на экспрессию PD-L1

[0252] В одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли относится к злокачественной опухоли, ассоциированной с низким или негативным статусом PD-L1 и/или негативной сигнатурой гена IFN γ , и, необязательно, с плотностью инфильтрации CD8⁺ Т-клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (например, рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2+, HER2- (HR+), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, рак уротелия), рак предстательной железы (например, кастрационно-резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечно-клеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[0253] В еще одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), и может быть необязательно ассоциирован с одним или более из плотности инфильтрации CD8⁺ Т-клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и негативной сигнатуры гена IFN γ , включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи, назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак сленной железы, рак пищевода), рак молочной железы (например, ER+/HER2-, воспалительный, тройной негативный), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желеывыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медустинальную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина) или мезотелиому.

[0254] Каждая из стадий получения образца ткани, приготовления одного или более срезов ткани для анализа ИНС, проведения окрашивания ИНС и оценки результатов может выполняться отдельными лицами/субъектами в одном месте или в разных местах. Например, хирург может выполнить биопсию и получить образец ткани из опухоли больного раком и затем отправить образец ткани в патологоанатомическую лабораторию,

в которой может быть проведена фиксация образца ткани и затем приготовление одного или более микроскопических препаратов, каждый с одним срезом ткани, для анализа ИНС. Микроскопический препарат(ы) можно анализировать ИНС вскоре после приготовления или хранить для последующего анализа. Лаборатория, которая приготовила срез ткани для анализа ИНС, может провести анализ или отправить микроскопический препарат(ы) в другую лабораторию для проведения анализа. Патологоанатом или квалифицированный специалист, который оценивает окрашенные микроскопические препараты в отношении окрашивания на PD-L1, может работать в диагностической лаборатории или может быть независимым исполнителем по контракту. Альтернативно, одна диагностическая лаборатория получает образец ткани от лечащего врача или хирурга субъекта, и затем выполняет все стадии, включающие приготовление срезов ткани, окрашивание микроскопического препарата(ов) и оценку экспрессии PD-L1 на окрашенном микроскопическом препарате(ах) или отправляет окрашенный микроскопический препарат(ы) квалифицированному специалисту для оценки PD-L1.

[0255] В некоторых вариантах осуществления лица, участвующие в приготовлении и анализе среза ткани анализом ИНС, не осведомлены об идентичности субъекта, образец которого тестируется; т. е. образец, полученный лабораторией, каким-то образом делают анонимным перед отправкой в лабораторию. Например, образец можно просто идентифицировать по номеру или некоторому другому коду («идентификатору образца»), и результаты анализа ИНС сообщаются стороне, заказывающей анализ, используя идентификатор образца. В предпочтительных вариантах осуществления связь между идентичностью субъекта и образцом ткани субъекта известна только субъекту или лечащему врачу субъекта.

[0256] В некоторых вариантах осуществления после того, как результаты теста были получены, диагностическая лаборатория генерирует протокол испытания, который может включать результат о том, что образец ткани был положительным или негативным в отношении экспрессии PD-L1. Протокол испытания может также включать указание о том, как интерпретировать результаты для прогнозирования того, может ли субъект отвечать на комбинированную терапию пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом/ талимогеном лагерпарепвеком. Например, в одном варианте осуществления, если оценка для опухоли пациента находится ниже заранее установленного порога, то в протоколе испытания может указываться, что у пациента имеется оценка экспрессии PD-L1, которая коррелирует с ответом или лучшим ответом на лечение комбинированной терапией пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом/талимогеном лагерпарепвеком, в то время как если оценка экспрессии PD-L1 находится на уровне или выше заранее установленного порога, то оценка экспрессии PD-L1 коррелирует с отсутствием ответа или плохим ответом на лечение комбинированной терапией пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или его антигенсвязывающим фрагментом/ талимогеном лагерпарепвеком.

[0257] В некоторых вариантах протокол испытания представляет собой письменный документ, подготовленный диагностической лабораторией и отправленный пациенту или лечащему врачу пациента в виде бумажной копии или по электронной почте. В еще одних вариантах осуществления протокол испытания генерируется компьютерной программой и отображается на видеомониторе в кабинете врача. Протокол испытания может также включать устную передачу результатов испытания непосредственно пациенту, лечащему врачу пациента или уполномоченному сотруднику в офисе врача. Аналогичным образом, протокол испытания может содержать запись результатов теста, которые врач делает в файле пациента.

Методы количественной оценки лимфоцитов

Проточная цитометрия

[0258] Субпопуляции лимфоцитов обычно анализируют с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания клеток флуорохромами, конъюгированными со специфическими моноклональными антителами, и количественного определения доли специфически меченных клеток с помощью проточной цитометрии. Ручные альтернативы проточной цитометрии также доступны для количественной оценки CD4 клеток. Это простые методы световой или флуоресцентной микроскопии, для которых просто требуется подсчет клеток.

[0259] В проточной цитометрии специфические моноклональные антитела, полученные против специфических антигенов CD, присутствующих в клетках, метят флуоресцентными красителями. Меченым моноклональным антителам обеспечивается возможность реагировать с моноклеарными клетками (лимфоцитами и моноцитами), и реагирующие клетки можно классифицировать проточным цитометром на субпопуляции в зависимости от того, какие антитела связаны. Проточная цитометрия обычно дает процент клеток CD4⁺ или CD8⁺. Для получения абсолютного количества клеток используются технологии с двумя и одной платформой. В технологии двойной платформы используется проточный цитометр и гематологический анализатор. Абсолютный подсчет CD4 с использованием двухплатформенного подхода является продуктом трех измерений: количества лейкоцитов, процентного содержания лейкоцитов, которые являются лимфоцитами (дифференциальный анализ), и процентного содержания лимфоцитов, которые являются CD4 клетками (определяется методом проточной цитометрии). Если используется технология с одной платформой, то измеряется абсолютное количество субпопуляций лимфоцитов в одной пробирке одним прибором. Обычно это достигается добавлением фиксированного объема образца с известным количеством флуоресцентных бусин (системы на основе бусин) или точной записью регистрацией анализируемого образца. Недавние рекомендации предполагают, что технология с одной платформой должна быть золотым стандартом для определения абсолютного количества CD4.

[0260] Существует несколько разновидностей проточных цитометров, где наиболее популярными являются FACSCalibur (Becton Dickinson) и EPICS XL (Beckman Coulter). Эти инструменты обеспечивают высокую пропускную способность образцов, управление

рабочим процессом посредством автоматизации и простые программные приложения. На обоих указанных приборах можно определять четыре цвета и измерять относительный размер клетки и сложность клеток. Системы предназначены для использования цельной крови, собранной с добавлением раствора ЭДТА. Помимо использования традиционных проточных цитометров (открытых платформ, в которых может использоваться технология с двумя или одной платформой), для подсчета CD4⁺ Т-клеток разработаны упрощенные специализированные платформы. Коммерчески доступные специализированные платформы включают FACScount (Becton Dickinson), CyFlow Counter (Partec) и Guava Auto CD4/CD8% (Millipore/Merck). Специализированные платформы позволяют подсчитывать CD4⁺ Т-клетки с уменьшенной технической сложностью, обеспечивая абсолютное количество CD4 и соотношение CD4/CD8 без необходимости применения внешнего компьютера. Для системы используют цельную кровь, устраняется необходимость в стадиях лизиса и промывания и имеет место уникальный программный алгоритм, который автоматически идентифицирует популяции лимфоцитов, представляющих интерес.

Ручные методы количественной оценки лимфоцитов

[0261] Ручные альтернативы проточной цитометрии, доступные на рынке, представляют собой: Cyto-Spheres (Coulter Corporation, США) и Dynabeads (Dynal AS, Норвегия). Набор Dynal T4 (Dynabeads) используется для ручного подсчета CD4 клеток в камере для подсчета клеток под микроскопом. В данном методе измеряется абсолютное количество CD4 клеток; процент лимфоцитов не может быть определен. Для этого требуется эпифлуоресцентный микроскоп (рекомендуется), хотя это может быть выполнено с помощью только светового микроскопа; гемоцитометр, вортекс, качающаяся кювета, таймер и магнит. Магнитные шарики покрыты моноклональными антителами в виде твердой фазы для выделения CD4 и CD8 клеток из цельной крови, тогда как CD4-позитивные моноциты предварительно истощаются с использованием магнитных шариков CD14. После выделения клеток CD4 клетки лизируют, окрашивают и подсчитывают. Образцы крови должны быть свежесобранными, желательно отобранные не более чем в течение 24 ч. Для набора для подсчета CD4 Manual Coulter Manual (для метода Cyto-Spheres) требуется световой микроскоп, таймер и гемоцитометр, и измеряются абсолютные количества CD4 (не в процентах) из цельной крови, собранной в пробирки с ЭДТА. Покрытые антителами латексные частицы используются для связывания CD4 клеток, что приводит к образованию «розетки» латексных шариков вокруг каждой CD4 клетки; розетка легко распознается с помощью световой микроскопии. Реагент, блокирующий моноциты, сводит к минимуму помехи от моноцитов, которые содержат антигены CD4, потому что они могут быть распознаны во время подсчета клеток CD4.

[0262] Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, описанных в данном документе, могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки объема вариантов осуществления, раскрытых здесь. Теперь, подробно описав некоторые

варианты осуществления, они будут более понятны со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

Диагностическое тестирование на экспрессию CD8+

[0263] В одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли происходит из злокачественной опухоли, ассоциированной с плотностью инфильтрации CD8+ Т-клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), необязательно имеющей низкий или негативный статус PD-L1 и/или негативную сигнатуру гена IFN γ , включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи), колоректальный рак, рак молочной железы (например, HER2+, HER2-(HR+), тройной негативный), рак яичника, рак мочевого пузыря (например, переходноклеточный рак, уротелиальный рак), рак предстательной железы (например, кастрационно-резистентный), саркому (например, мягких тканей, кости), почечноклеточный рак, рак желудка, рак пищевода, рак анального канала, рак желчевыводящих путей и рак поджелудочной железы.

[0264] В еще одном варианте осуществления тестируемый образец опухоли происходит из злокачественной опухоли, которая отвечает на монотерапию ингибитором контрольных точек (например, анти-PD-L1 терапию или анти-PD-1 терапию (например, пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом)), которая может быть необязательно ассоциирована с одним или более из плотности инфильтрации CD8+ Т-клеток ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток на 1 мм² образца (или на 1 мл образца), низкого или негативного статуса PD-L1 и негативной сигнатуры гена IFN γ , включая, не ограничиваясь этим, меланому (например, кожную, метастатическую, увеальную), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи (например, рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи), назофарингеальный рак, рак щитовидной железы, рак слюнной железы, рак пищевода, рак молочной железы (например, ER+/HER2- рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы), рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), почечноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта (например, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак, рак анального канала), рак желчевыводящих путей, множественную миелому, лимфому (например, медиастинальные В-крупноклеточные лимфомы, лимфому Ходжкина) и мезотелиому.

[0265] Каждая из стадий получения образца, подготовки образца для проточной цитометрии, выполнения проточной цитометрии и оценки результатов может быть

выполнена отдельными лицами/субъектами в одних и тех же или разных местах. Например, хирург может получить биопсию образца от больного раком и затем отправить образец в патологоанатомическую лабораторию, которая может подготовить образец для проточной цитометрии. Микроскопический препарат(ы) может быть анализирован ИНС вскоре после подготовки или сохранен для последующего анализа. Лаборатория, которая подготовила образец для проточной цитометрии, может провести анализ или отправить микроскопический препарат(ы) в другую лабораторию для проведения анализа. Патологоанатом или квалифицированный специалист, выполняющий проточную цитометрию, может работать в диагностической лаборатории или может быть независимым сотрудником по контракту. В качестве альтернативы, одна диагностическая лаборатория получает образец от лечащего врача или хирурга пациента, и затем выполняет все стадии, связанные с подготовкой образца и подсчетом CD8+ клеток в образце или отправкой образца квалифицированному специалисту для подсчета CD8+ клеток.

[0266] В некоторых вариантах осуществления лица, участвующие в приготовлении и анализе образца проточной цитометрией, не осведомлены об идентичности субъекта, образец которого тестируется; т. е. образец, полученный лабораторией, каким-то образом делают анонимным перед отправкой в лабораторию. Например, образец можно просто идентифицировать по номеру или некоторому другому коду («идентификатору образца»), и результаты анализа проточной цитометрией сообщаются стороне, заказывающей анализ, используя идентификатор образца. В предпочтительных вариантах осуществления связь между идентичностью субъекта и образцом ткани субъекта известна только субъекту или лечащему врачу субъекта.

[0267] В некоторых вариантах осуществления после того, как результаты анализа были получены, диагностическая лаборатория генерирует протокол испытания, который может включать указание о том, как интерпретировать результаты для прогнозирования того, может ли субъект отвечать на комбинированную терапию пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или их антигенсвязывающим фрагментом/талимогеном лагерпарепвеком. Например, в одном варианте осуществления, если оценка опухоли пациента находится ниже заранее установленного порога, то в протоколе испытания может указываться, что пациент имеет оценку экспрессии CD8+, которая коррелирует с ответом или лучшим ответом на лечение комбинированной терапией пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или их антигенсвязывающим фрагментом/талимогеном лагерпарепвеком, в то время как если оценка экспрессии CD8+ равна или выше заранее установленного порога, то оценка экспрессии CD8+ коррелирует с отсутствием ответа или плохим ответом на лечение комбинированной терапией пембролизумабом, вариантом пембролизумаба и/или их антигенсвязывающим фрагментом/талимогеном лагерпарепвеком.

[0268] В некоторых вариантах протокол испытания представляет собой письменный документ, подготовленный диагностической лабораторией и отправленный

пациенту или лечащему врачу пациента в виде бумажной копии или по электронной почте. В других вариантах протокол испытания генерируется компьютерной программой и отображается на видеомониторе в кабинете врача. Протокол испытания может также включать устную передачу результатов испытаний непосредственно пациенту, лечащему врачу пациента или уполномоченному сотруднику в офисе врача. Аналогичным образом, протокол испытания может содержать запись результатов теста, которые врач делает в файле пациента.

[0269] Специалистам в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, описанных в данном документе, могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов без отклонения от объема вариантов осуществления, раскрытых в данном документе. Теперь, подробно описав некоторые варианты осуществления, они будут более понятны со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения. Все патенты, патентные заявки и ссылки, описанные здесь, включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей.

Примеры

Пример 1. Фаза 1b клинического испытания комбинации талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба

[0270] Фаза 1b клинического испытания (MASTERKEY-265; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02263508) была спланирована для пациентов с меланомой на поздних стадиях, с комбинацией интратуморальной инъекции талимогена лагерпарепвека и системного введения анти-PD-1-антитела, пембролизумаба, с биопсией в исходном периоде и повторными биопсиями во время лечения, с первичной целью оценки безопасности этой комбинации, и изучения ее способности усиливать воспалительный статус опухолей.

[0271] Включенные в исследование пациенты (≥ 18 лет) имели гистологически подтвержденную, хирургически неоперабельную, кожную меланому IIIB-IV стадии, измеряемые проявления заболевания (≥ 1 очаг меланомы с самым большим диаметром ≥ 10 мм) и ≥ 1 инъеклируемые кожные, подкожные или узловые очаги меланомы, самый большой диаметр которых составлял ≥ 10 мм, либо по отдельности, либо в совокупности, для которых хирургическое вмешательство не было рекомендовано. Пациенты должны были иметь адекватное общее состояние и гематологические показатели, показатели функции печени и почек, и показатели свертываемости крови. Пациентов исключали из исследования, если у них была увеальная меланома/меланома слизистых оболочек; ранее лечились по поводу меланомы на поздних стадиях с использованием системной терапии, ранее получали талимоген лагерпарепвек или какое-либо предшествующее системное противоопухолевое лечение, обычно применяемое для неоперабельной меланомы IIIB-IV стадии; показатель общего состояния по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) ≥ 2 ; активные метастазы в головном мозге; активные герпетические поражения кожи; предшествующие осложнения герпетической инфекции; или для них

требовалось системное противогерпетическое лечение, кроме периодического местного применения. Все пациенты дали письменное информированное согласие. Процедуры обучения были утверждены комитетом по этике в каждом центре.

Дизайн исследования

[0272] Фаза 1b в исследовании MASTERKEY-265 представляла открытое многоцентровое исследование с одной группой, в котором в основном оценивалась безопасность интратуморального введения талимогена лагерпарепвека в комбинации с внутривенным введением пембролизумаба (фиг. 6).

[0273] Вкратце, пациентам, не получавшим вируса герпеса простого с видоизмененной серологической специфичностью, вводили в очаг талимоген лагерпарепвек в дозе 10^6 БОЕ/мл на день 1 недели 1 исследования. Последующие дозы талимогена лагерпарепвека, составляющие 10^8 БОЕ/мл, вводили на день 1 недели 4 и 6, и затем раз в 2 недели. До 4 мл (общий объем) талимогена лагерпарепвека можно было вводить инъекцией в очаг при каждом визите во время лечения. Объем, вводимый в каждый инъецированный очаг, зависел от диаметра очага (Hoffner B., Iodice G.M. and Gasal E. (2016). Administration and Handling of Talimogene Laherparepvec: An Intralesional Oncolytic Immunotherapy for Melanoma. *Oncol. Nurs Forum*, 43, 219–226). Инъецированный объем на очаг варьировался от 0,1 мл для очагов размером $\leq 0,5$ см до 4,0 мл для очагов размером > 5 см с самым большим диаметром. Введение талимогена лагерпарепвека продолжали до исчезновения инъецированных очагов, полного ответа (CR), подтвержденного прогрессирования заболевания (PD) согласно модифицированным иммунологическим критериям оценки ответа на лечение (irRC), (Wolchok et al., 2009), по причине непереносимости лечения, 24 месяцев от первой дозы пембролизумаба, или до конца исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Если имела место токсичность, то введение доз талимогена лагерпарепвека можно было откладывать на срок до 4 недель; задержки > 4 недель приводили к окончательному прекращению лечения.

[0274] Пембролизумаб (200 мг) вводили внутривенно раз в 2 недели, начиная со дня 1 недели 6 (т.е. на время третьей дозы талимогена лагерпарепвека). Лечение пембролизумабом должно было продолжаться до тех пор, пока не было подтверждено PD по irRC, по причине непереносимости лечения, 24 месяца после введения первой дозы пембролизумаба или до конца исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Введение пембролизумаба отменяли или прекращали в соответствии с правилами, установленными протоколом, согласно инструкции по применению препарата в США (Kaufman H.L., Kim D.W., DeRaffele G., Mitcham J., Coffin R.S. and Kim-Schulze S. (2010). Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 17, 718–730). Если введение пембролизумаба останавливали на > 12 недель, то лечение пембролизумабом прекращали окончательно.

[0275] Первичной конечной точкой была частота токсичности, ограничивающей

дозу (DLT), начиная с того момента, когда оба препарата вводили в комбинации. Частота DLT у первых 6 пациентов с DLT-оценкой и дополнительные данные по безопасности от всех пациентов оценивались экспертной группой по уровням доз. Комбинация считалась переносимой, если частота DLT составляла $<33\%$ в течение периода оценки DLT. Вторичные конечные точки включали подтвержденную частоту объективного ответа (ORR; частоту CR плюс частичный ответ (PR)), оцененные исследователями согласно критериям irRC, (Wolchok et al., 2009), лучший общий ответ и частоту проявления АЕ.

[0276] DLT определяли как любой из следующих связанных с лечением токсических эффектов, возникающих в течение 6-недельного периода от начала лечения пембролизумабом: негематологическая токсичность 4 степени; пневмонит 3/4 степени; негематологическая токсичность 3 степени, сохраняющаяся > 3 дней, несмотря на оптимальную поддерживающую терапию (кроме утомляемости 3 степени); негематологические лабораторные показатели 3/4 степени, требующие медицинского вмешательства/госпитализации или продолжающиеся > 1 недели; фебрильная нейтропения 3/4 степени; тромбоцитопения $< 25 \times 10^9/\text{л}$, если она связана с опасным для жизни кровотечением или кровотечением, требующим инфузии тромбоцитов; любая токсичность 5 степени; или любая токсичность, требующая длительного прекращения приема талимогена лагерпарепвека или пембролизумаба.

Клинические оценки в исследовании

[0277] Неблагоприятные события, имеющие место в течение 1–30 дней после последней дозы исследуемого лечения, регистрировали и оценивали с использованием Общих терминологических критериев для нежелательных явлений, версия 4.0.

[0278] Опухолевый ответ исследователи оценивали по модифицированным критериям irRC (Wolchok J.D., Hoos A., O'Day S., Weber J.S., Hamid O., Lebbe C., Maio M., Binder M., Bohnsack O., Nichol G. et al. (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. Clin. Cancer Res., 15, 7412–7420). Полный ответ определяли как исчезновение всех очагов; PR определяли как уменьшение площади опухоли $\geq 50\%$ относительно исходного уровня; PD определяли как увеличение площади опухоли $\geq 25\%$ относительно самого низкого уровня; и SD определяли как любой результат, не отвечающий критериям ответа или PD с ≥ 77 дней, прошедших после включения в исследование. Ответы подтверждали в течение 4 недель с даты первой регистрации ответа. Оценки опухолей проводили при скрининге, на неделе 6 (до начала введения пембролизумаба), на неделе 18 и затем каждые 12 недель. Рентгенографическую визуализацию для оценки очагов проводили с использованием компьютерной томографии, позитронно-эмиссионной томографии, магнитно-резонансной томографии или ультразвукового обследования. Клиническое измерение кожных, подкожных и пальпируемых узлов опухоли проводили с помощью штангенциркуля. Первоначальное измерение PD было подтверждено оценкой измеряемых/неизмеримых новых очагов, а также индексных очагов спустя ≥ 4 недели. Если их состояние было клинически стабильным, то пациенты продолжали лечение,

ожидаая подтверждения PD.

Анализ биомаркеров

Проточная цитометрия

[0279] Субпопуляции Т-клеток анализировали проточной цитометрией со следующими маркерами CD45, CD3, CD4, CD8 и BD TruCOUNT. Кроме того, оцененные маркеры контрольных точек включали HLA-DR, PD-1, Tim3, BTLA, ICOS, OX40, 41BB и GITR на субпопуляциях Т-клеток, что определяли по экспрессии CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA.

Профилирование РНК и сигнатура гена IFN γ

[0280] Общую фракцию РНК выделяли из фиксированных в формалине парафинизированных срезов (FFPE) толщиной 5 мкм, фиксированных на положительно заряженных предметных стеклах. Вначале определяли процентную площади опухоли и либо вся ткань была соскоблена для выделения, либо, если присутствовало <50% площади опухоли, то опухолевая ткань была подвергнута макроразрезу для выделения. Выделение РНК проводили с использованием набора для выделения РНК High Pure FFPE производства Roche Diagnostics (Indianapolis, IN). Профилирование экспрессии генов анализом NanoString проводили с использованием 50 нг РНК, на панели иммунологического профилирования nCounter PanCancer производства NanoString Technologies (Seattle, WA) в соответствии с инструкциями производителя. Нормализованные значения экспрессии генов по результатам анализа NanoString рассчитывали вычитанием log₁₀-трансформированных необработанных значений для каждого гена из рассчитанного log₁₀ среднего числа генов домашнего хозяйства. Оценка сигнатуры гена гамма интерферона была получена с использованием расчета, в котором сравнивали нормализованное значение с предварительно определенной взвешенной оценкой для каждого гена в сигнатуре.

Иммуногистохимия

[0281] Экспрессию PD-L1 в опухоли оценивали анализом ИHC, как описано ранее (Daud A.I., Wolchok J.D., Robert C., Hwu W.J., Weber J.S., Ribas A., Hodi F.S., Joshua A.M., Kefford R., Hersey P. et al. (2016). Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. J. Clin. Oncol., 34, 4102–4109), используя исследовательскую версию анализа Dako PD-L1 22C3.

[0282] Для анализа ИHC на CD8 и гранзим В, проводили окрашивание гематоксилин-эозином, и патологоанатом исследовал препараты для подтверждения наличия меланомы и для определения областей опухоли, представляющих интерес для анализа. Мышиное моноклональное анти-CD8-антитело, клон CD8/144В использовали для анализа ИHC на CD8. Мышиное моноклональное антитело против гранзима В, клон GrB-7 (Dako) использовали для анализа ИHC на гранзим В. Иммуногистохимическое детектирование проводили с использованием метода детектирования на основе полимеров и красного хромогена. Микроскопические препараты сканировали с использованием системы ScanScope CS или AT Turbo (Aperio, Vista, CA, USA), область опухоли обводили

кружком, и оценивали плотность положительных клеток (например, CD8–положительных клеток на мм²) с помощью автоматического анализа изображений.

Иммунофлуоресценция

[0283] Доступные парные биопсии, полученные до и после лечения, оценивали с использованием технологии MultiOmyx™ для окрашивания на 12 биомаркеров с использованием одного предметного стекла. Повторные циклы окрашивания с использованием пары антител, непосредственно конъюгированных с Cy3 или Cy5, с последующей визуализацией и инактивацией красителя выполняли согласно опубликованным методам (Au et al., 2016; Gerdes et al., 2013).

Количественное определение и статистический анализ

[0284] Используя дизайн исследования 6+3, требовалось оценить DLT у шести–девяти пациентов, для получения профиля DLT талимогена лагерпарепвека в комбинации с пембролизумабом, предполагая, что истинный уровень проявления DLT находится между 11%–33%. Дополнительные пациенты были включены для оценки связи между биомаркерами и ответом.

[0285] Анализ DLT включал всех пациентов, у которых оценивали DLT, включенных в фазу 1b, которые имели возможность лечиться ≥ 6 недель от начальной дозы пембролизумаба и которые получали ≥ 2 дозы талимогена лагерпарепвека и 2 дозы пембролизумаба в комбинации или кто испытал DLT в течение 6 недель после начала комбинированной терапии. В анализ безопасности включали всех пациентов, которые получали ≥ 1 дозы талимогена лагерпарепвека или пембролизумаба. Прогностический анализ биомаркеров включал всех пациентов с исходным результатом по биомаркерам; анализ изменений биомаркеров включал всех пациентов с исходным результатом по биомаркерам и ≥ 1 последующим результатом оценки биомаркеров.

[0286] Соответствующие точные 95% доверительные интервалы (95% CI) рассчитывали для ORR и частоты контроля заболевания. PFS (время от включения в исследование до прогрессирования заболевания согласно модифицированным irRC или смерть) и OS (время от включения в исследование до смерти) оценивали с использованием метода Каплана–Мейера.

[0287] Для результатов определения плотности клеток или H–показателя по данным анализа ИНС изменение по сравнению с исходным уровнем оценивали с помощью критерия «знак–тест» для log2 отношения для после исходного уровня к исходному уровню (неделя 1) в инъецированных и неинъецированных очагах по отдельности. Для результатов проточной цитометрии, изменение от исходного уровня оценивали с помощью линейной модели смешанных эффектов с исходным уровнем в качестве ковариаты для log10 отношения (абсолютные значения или MESF) или % разницы к/от исходного уровня. Для многопараметрической визуализации на основе иммунофлуоресценции влияние на плотность клеток оценивали с помощью линейной модели смешанных эффектов для кубического корня плотности с факторами визита и статуса инъекций (Ribas, A. (2015). Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from

Immune Attack. Cancer Discov., 5, 915–919).

[0288] Ассоциацию с неподтвержденным наилучшим ответом для каждого исследователя на август 2016 года оценивали с помощью логистической регрессии ответа (CR или PR) в сравнении с результатами по постоянным биомаркерам в исходном периоде или изменению от исходного периода при данном визите. Преобразованные результаты использовали для анализа. Инъекцированные и неинъекцированные очаги анализировали по отдельности. Критерий Крускала–Уоллиса также оценивался в случаях небольшого размера выборки.

[0289] FDR контролировали на уровне 5% с помощью метода Бенджамини–Хохберга, и анализ проточной цитометрией стратифицировали по приоритетному набору конечных точек и метрике в отчетах (Abs, MESF,%).

Данные и доступность программного обеспечения

[0290] Статистический анализ проводили с использованием SAS версии 9.2 (SAS Institute, Cary, NC). Статистический анализ биомаркеров проводили с использованием Matlab R2015a (The Mathworks Inc., Natick, MA).

[0291] Пример 2: безопасность и переносимость комбинации талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба

[0292] В фазе 1b клинического испытания талимоген лагерпарепвек вводили интратуморально и пембролизумаб вводили внутривенно 21 пациенту с меланомой на поздних стадиях, у которых были очаги на коже, доступные для инъекционного введения. Комбинация, как правило, хорошо переносилась, с наличием утомляемости, лихорадки и озноба как наиболее распространенных побочных эффектов. Отсутствовала какая-либо ограничивающая дозы токсичность. У одного пациента был пневмонит, известная токсическая реакция для анти-PD-1 терапии. Частота подтвержденного объективного ответа составила 62%, и полного ответа – 33%. У пациентов, которые отвечали на комбинацию талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, отмечалось увеличение количества CD8+ Т-клеток в опухолях после введения талимогена лагерпарепвека. После лечения талимогеном лагерпарепвеком уровень PD-L1 повышался на многих субпопуляциях иммунных клеток в опухолях наряду с экспрессией гена интерферона гамма. Ответ на комбинированную терапию не зависел от исходной инфильтрации CD8+ Т-клетками или сигнатуры интерферона гамма. Полученные данные показали, что интратуморальная инъекция талимогена лагерпарепвека может благоприятно изменить микроокружение опухоли, привлекая Т-клетки в опухоль, тем самым способствуя клинической активности терапии на основе блокады PD-1.

[0293] Фаза 1b включала исходную биопсию до начала интратуморальных инъекций талимогена лагерпарепвека, с первой инъекцией до $4 \text{ мл} \times 10^6$ бляшкообразующих единиц (pfu) на мл с целью индуцирования сероконверсии и защитного иммунного ответа на онколитический вирусный вектор, и затем через три недели повторными инъекциями полной дозы до $4 \text{ мл} \times 10^8$ БОЕ/мл талимогена лагерпарепвека раз в две недели (фиг. 1A). Вторую биопсию опухоли выполняли до

введения второй полной дозы талимогена лагерпарепвека и до начала введения пембролизумаба в дозе 200 мг внутривенно раз в 2 недели, что совпадало со следующими дозами талимогена лагерпарепвека. Подготовительный период с введением талимогена лагерпарепвека в виде одного агента был разработан для анализа того, каким образом интратуморальная инъекция талимогена лагерпарепвека изменяет микроокружение опухоли до начала комбинированной терапии. Третья биопсия опухоли была запланирована в ходе комбинированной терапии (фиг. 1А и 6). В клиническое исследование был включен 21 пациент с меланомой на поздних стадиях и периферическими очагами, доступными для интратуморальной инъекции в период с декабря 2014 года по март 2015 года (полные характеристики пациентов приведены в таблице 2). Пациенты наблюдались в среднем в течение 18,8 месяцев (от 17,7 до 20,7) на момент отчета.

[0294]

Таблица 2

Исходные демографические и клинические характеристики

	талимоген лагерпарепвек плюс пембролизумаб (N=21)
Пол, n (%)	
Женщины	13 (62)
Мужчины	8 (38)
Средний (пределы) возраст, y	58 (37–89)
Общее состояние по шкале ECOG, n (%)	
0	19 (90)
1	2 (10)
Подстадия заболевания, n (%)	
IIIB	1 (5)
IIIC	6 (29)
IVM1a	2 (10)
IVM1b	4 (19)
IVM1c	8 (38)
ЛДГ, n (%)	
≤ВГН	16 (76)
>ВГН до 2× ВГН	5 (24)
>2× ВГН	0
Серологический статус HSV, n (%)	
Положительный	16 (76)
Отрицательный	5 (24)
Статус BRAF, n (%)	

Мутантный	4 (19)
Дикого типа	17 (81)
Статус PD–L1*, n (%)	
Положительный	17 (81)
Отрицательный	2 (10)
Неизвестный	2 (10)

ECOG, Восточная кооперативная онкологическая группа; HSV, вирус простого герпеса; ЛДГ, лактатдегидрогеназа; PD–L1, лиганд белка запрограммированный смерти 1; ВГН, верхняя граница нормы

* Пороговое значение по позитивности составляло $\geq 1\%$ PD–L1 по данным иммуногистохимии

[0295] При комбинированной терапии не наблюдали какой-либо новой или ограничивающей дозу токсичности ни у одного из 21 пациента. Наиболее частыми побочными эффектами были утомляемость (62%), озноб (48%) и лихорадка (43%), которые и ожидали при интратуморальной инъекции талимогена лагерпарепвека (Andtbacka et al., 2015). Частыми побочными эффектами, связанными с пембролизумабом, были утомляемость (62%), сыпь (33%) и артралгия (33%), которые и ожидали для этого агента (Ribas et al., 2016). Единственное серьезное нежелательное явление, отнесенное исследователями как, потенциально связанное с комбинацией, был синдром высвобождения цитокинов 1 степени (один пациент). Серьезные побочные эффекты, связанные с пембролизумабом, включали аутоиммунный гепатит 3 степени, асептический менингит 3 степени и пневмонит 4 степени (в каждом случае у одного пациента). У пациента с асептическим менингитом, связанным с лечением, в цереброспинальной жидкости не было обнаружено вируса простого герпеса, и пациент, прекративший терапию талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом месяцем ранее, был переведен на терапию дабрафенибом и траметинибом во время первого проявления этого неблагоприятного события.

Пример 3. Противоопухолевая активность комбинации талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба

[0296] Подтвержденная частота объективного ответа согласно иммунологическим критериям оценки ответа (irRC) (Wolchok et al., 2009) составила 61,9% (95% CI, 38,4%–81,9%), с подтвержденной частотой полного ответа 33,3% (95% CI, 14,6%–57,0%) (таблица 3). Ответы имели место на всех стадиях меланомы (фиг. 1B и 1C). У девяти пациентов наблюдали временное увеличение общего размера опухоли во время введения талимогена лагерпарепвека, в частности после первой субтерапевтической дозы и до получения полной дозы талимогена лагерпарепвека вместе с пембролизумабом, но, тем не менее, позднее эти опухолевые очаги отвечали на комбинированную терапию (фиг. 1D). Медиана выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS) и общей выживаемости (OS) не была достигнута во время периода последующего наблюдения (фиг. 1E и 1F).

Комбинированное лечение привело к уменьшению размера более чем на 50% в 82% инъецированных, в 43,5% неинъецированных невисцеральных и 33,4% неинъецированных висцеральных очагах (фиг. 6).

[0297]

Таблица 3

Наилучший общий ответ*

	Талимоген лагерпарепвек плюс пембролизумаб (N=21)	
	В целом [§]	Подтверждено [§]
Пациенты с ответом	15	13
Частота ответа, % (95% CI)	71 (48–89)	62 (38–82)
Наилучший общий ответ, n (%)		
Полный ответ	8 (38)	7 (33)
Частичный ответ	7 (33)	6 (29)
Стабильное заболевание [†]	1 (5)	3 (14)
Прогрессирующее заболевание	5 (24)	5 (24)
Частота контроля заболевания, n (%)	16 (76)	16 (76)

* Исследователи оценивали ответ по иммунологическим критериям оценки ответа на лечение

[†] Наилучший общий ответ в виде стабильного заболевания требовал оценки стабильного заболевания не ранее, чем через 77 дней после включения в исследование

[§] Ответы были подтверждены последующей оценкой, по меньшей мере, через 4 недели

Пример 4. Ответы опухоли, не зависящие от исходной инфильтрации CD8+ Т-клетками, статуса PD–L1 и сигнатуры интерферона

[0298] PD–L1 индуцируется гамма интерфероном, продуцируемым опухоль–инфильтрирующими антигенспецифическими Т–клетками, что называется резистентностью адаптивной иммунной системы, позволяющей опухолевым клеткам избегать цитотоксической активности Т–клеток (Pardoll, 2012; Ribas, 2015). Такие Т–клетки затем блокируются взаимодействиями PD–1:PD–L1. Пациенты, которые отвечают на терапию блокадой одним анти–PD–1 агентом, имеют более высокую исходную плотность инфильтрации CD8+ Т–клетками, сигнатуру экспрессии гена интерферона гамма и экспрессию PD–L1 (Herbst et al., 2014; Ribas et al., 2015; Tumeh et al., 2014). Исходные биопсии у пациентов в фазе 1b клинического испытания, описанного здесь, анализировали на плотность CD8+ Т–клеток, позитивность PD–L1 и сигнатуру гена интерферона гамма. В противоположность предыдущему опыту лечения одним агентом пембролизумабом (Ribas et al., 2015; Tumeh et al., 2014), ответы в настоящем клиническом

исследовании наблюдали у пациентов, у которых при исходной биопсии были очень низкие CD8⁺ Т-клеточные инфильтраты или имела место негативная сигнатура гена интерферона гамма, или имел место негативный статус PD-L1. Среди тринадцати биопсий с плотностью CD8⁺ ниже 1000 клеток/мм² девять пациентов ответили на терапию, и у четырех пациентов имело место прогрессирование заболевания (фиг. 2А). Из пяти исходных биопсий с низкой сигнатурой интерферона гамма у трех пациентов был полный ответ, и у двух – прогрессирование заболевания (фиг. 2В). Была только одна исходная биопсия, которая была оценена как негативная для PD-L1, но у этого пациента был полный ответ на комбинированную терапию (фиг. 2С).

Пример 5. Интратуморальные инъекции талимогена лагерпарепвека усиливают инфильтрацию CD8⁺ Т-клетками у пациентов, которые отвечают на комбинированную терапию

[0299] Поскольку некоторые пациенты, у которых исходные биопсии имели относительно низкую плотность CD8⁺ клеток и не были положительными для сигнатуры гена интерферона гамма, имели объективный ответ, их включили в подготовительный период, где вводили один агент талимоген лагерпарепвек, чтобы определить, насколько талимоген лагерпарепвек изменил микроокружение опухоли, обеспечивая приток Т-клеток в метастатические очаги меланомы у пациентов, которые ответили на терапию. Действительно, иммуногистохимический анализ (ИНС), в котором сравнивали исходные биопсии с биопсиями, выполненными после введения одного талимогена лагерпарепвека, показал увеличение плотности инфильтрирующих CD8⁺ Т-клеток в восьми из двенадцати инъецированных очагов, доступных для анализа, которая дополнительно увеличилась в некоторых из биопсий, полученных на время комбинированной терапии (фиг. 3А и 3В). У трех пациентов с ответом на терапию плотность CD8⁺ снизилась при биопсии в ходе терапии, и еще у одного пациента изменения в плотности CD8⁺ отсутствовали. У трех пациентов, у которых не было ответа, в биопсиях в ходе терапии наблюдали снижение плотности CD8⁺. В целом, увеличение плотности CD8⁺ было наиболее очевидным в инъецированных очагах у пациентов, которые отвечали на терапию (фиг. 3В), наличие связи поддерживалось логистической регрессией ($p=0,0048$, фиг. 8А). Изменение плотности инфильтрации CD8⁺ было различным в неинъецированных очагах на неделе 6 даже у пациентов, которые позднее ответили на терапию, с оговоркой, что для интерпретации было доступно только три таких биопсии (фиг. 3В). Было установлено, что некоторые биопсии имеют низкое остаточное количество опухолевой ткани после лечения (как показано пустыми символами на фиг. 3В и 3С), что, без намерения быть связанным научной теорией, могло быть вызвано либо полным патологическим ответом в этом месте, либо наличием биопсии, в которой был пропущен остаток меланомы. Четыре из пяти ответных биопсий с истощенной опухолевой тканью в образцах показали относительно высокую плотность CD8⁺ Т-клеток на неделе 6 по сравнению с биопсией одного пациента с прогрессированием заболевания, включенного в этот ряд. Анализ ИНС также проводили для гранзима В, компонента цитотоксических гранул (связанного с субпопуляциями CD8⁺

Т-клеток и NK-клеток), который, как было показано, увеличивался в опухолях после блокады PD-1 (Tumeh et al., 2014). Тенденция, свидетельствующая о повышении уровня гранзима В в опухолях после применения талимогена лагерпарепвека и комбинированного лечения, также наблюдалась, в частности, для биопсий с низким остаточным количеством опухолевой ткани (фиг. 3С). Кроме того, на основании анализа данных по экспрессии генов в опухоли было установлено, что уровни мРНК CD8+ альфа и интерферона гамма были повышены после лечения, что обеспечивает дополнительные подтверждающие доказательства наличия связанных с лечением изменений в микроокружении опухоли с увеличением количества продуцирующих интерферон гамма цитотоксических Т-клеток (фиг. 3D, 3E). CD8 альфа увеличился в 1,7 раза ($p=0,01$) в инъецированных очагах на неделе 6 по сравнению с исходным уровнем и в 1,44 раза ($p=0,0012$) в неинъецированных очагах. Аналогично, увеличение интерферона гамма для инъецированных и неинъецированных очагов составило 1,63 раза ($p=0,0004$) и 1,41 раза ($p=0,17$) соответственно.

Пример 6. Характеристика изменений в инфильтратах иммунных клеток в инъецированных и неинъецированных талимогеном лагерпарепвеком очагах

[0300] Для дальнейшей характеристики изменений в опухолях выполняли мультиплексное иммунофлуоресцентное окрашивание подмножества парных биопсий, проведенных на различные временные точки у 13 пациентов. Наблюдали изменения в широких пределах в отношении воспаления в опухоли после лечения талимогеном лагерпарепвеком на неделе 6, включая усиленную инфильтрацию иммунными клетками и явное увеличение клеток, экспрессирующих PD-L1, в восьми из десяти инъецированных опухолей и в двух из четырех неинъецированных опухолей (фиг. 4А). Иммунный инфильтрат включал приток значительной доли CD4+ и CD8+ Т-клеток, многих коэкспрессирующих PD-1, а также экспрессирующих CD56 клеток и CD20-позитивных В-клеток в биопсиях в ходе лечения у некоторых пациентов. Также наблюдали повышение плотности клеток, экспрессирующих маркер CD45RO Т-клеток памяти, и клеток, экспрессирующих маркер Foxp3 регуляторных Т-клеток (Treg) (фиг. 4А). Однако амплитуда увеличения эффекторных Т-клеток (Teff) была намного выше по сравнению с Treg, что привело к общему снижению соотношения Treg к Teff в опухолях после введения талимогена лагерпарепвека (фиг. 9), что согласуется с предыдущими сообщениями (Kaufman et al., 2010). Полный набор иммунофлуоресцентных анализов биопсийного материала представлен в таблице 4, данные которой дополнительно показывают, что отсутствовало очевидное увеличение плотности макрофагов по данным окрашивания на CD68. Пример повышенной плотности CD8+ и PD-L1 (иммунофлуоресцентный анализ) на неделе 6 и 30 по сравнению с исходным уровнем показан на фиг. 4В. На неделе 6 и 30 опухолевые клетки, совместно окрашивающиеся на S100 (синий) и PD-L1 (красный), проявляются вместе с Т-клетками CD8 (зеленый), демонстрируя коэкспрессию PD-L1. Материал биопсии, выполненной во время комбинированной терапии у пациента, отвечающего на терапию, почти полностью

представлял инфильтрирующие CD8⁺ Т-клетки. Дополнительные репрезентативные изображения представлены на фиг. 10.

Таблица 4

Изменения субпопуляций клеток в опухоли между инъецированными очагами на неделе 6 и исходными очагами (неделя 1)

Субпопуляция клеток	Средняя исходная плотность [клеток/мм ²] ^a	Отношение плотности на неделе 6 к исходному значению [†]	p-значение [‡]
CD3	204,21	2,57	$2,28 \times 10^{-23}$
CD4	68,96	2,73	$7,56 \times 10^{-21}$
CD8	126,15	2,47	$3,70 \times 10^{-20}$
FOXP3	32,53	1,70	$1,38 \times 10^{-8}$
PD1	202,24	2,27	$1,57 \times 10^{-17}$
PD-L1	172,28	2,73	$1,99 \times 10^{-16}$
CD68	71,01	1,09	0,41
CD45RO	204,57	1,56	$6,86 \times 10^{-6}$
CD56	339,99	1,31	$1,30 \times 10^{-3}$
CD20	1,58	5,33	$2,03 \times 10^{-9}$
CTLA	22,49	0,77	0,09
CD3CD8	89,82	2,64	$3,85 \times 10^{-20}$
CD3CD8PD1	61,69	2,40	$1,97 \times 10^{-15}$
CD3CD4	68,96	2,73	$7,56 \times 10^{-21}$
CD3CD4PD1	32,57	2,76	$9,26 \times 10^{-20}$
CD3CD4FOXP3	13,00	1,90	$1,46 \times 10^{-7}$
CD68PD_L1	10,61	2,35	$4,97 \times 10^{-9}$
CD3+CD4+PD_L1	8,43	4,74	$1,70 \times 10^{-20}$
CD3+CD4+CD45RO	29,72	2,02	$4,53 \times 10^{-8}$
CD3+CD8+CD45RO	40,52	1,94	$1,49 \times 10^{-7}$
CD3+CD8+PD-L1	9,43	4,19	$1,37 \times 10^{-16}$
CD3_CD8+CD56	1,01	3,34	$2,53 \times 10^{-6}$
CD3+CD8+CD56+PD_L1	0,06	5,31	$5,19 \times 10^{-5}$
CD3+CD4+PD1	32,57	2,76	$9,26 \times 10^{-20}$
CD3+CD8+PD1	61,69	2,40	$1,97 \times 10^{-15}$
CD3-CD20+	1,58	5,33	$2,03 \times 10^{-9}$
CD3-CD20+PD-L1	0,16	6,35	$1,15 \times 10^{-7}$

Пример 7. Изменения в функциональном фенотипе циркулирующих Т-клеток при комбинированной терапии

[0301] Изменения в иммунных клетках также анализировали в периферической крови в качестве потенциального фармакодинамического эффекта одного агента и комбинированной терапии. После терапии одним агентом талимогеном лагерпарепвеком у большинства пациентов наблюдали увеличение количества циркулирующих CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток в периферической крови, которое не увеличивалось при добавлении

пембролизумаба (фиг. 5A и 5B). Однако добавление пембролизумаба привело к тенденции к повышению количества делящихся CD8⁺ Т-клеток в крови, о чем свидетельствует увеличение Ki67+CD3+CD8⁺ Т-клеток (фиг. 5C). Анализ экспрессии различных рецепторов иммунных контрольных точек в циркулирующих CD3⁺ CD8⁺ Т-клетках выявил увеличение PD-1 и TIM-3 при введении одного агента талимогена лагерпарепвека (фиг. 5D и 5E), хотя изменения в BTLA отсутствовали (фиг. 5F). Какие-либо ассоциации ответа с исходными уровнями клеток или изменениями во времени не прошли наши ложные контроли детектирования.

Пример 8. Обсуждение

[0302] Это первое клиническое исследование комбинированной иммунотерапии у людей демонстрирует высокую частоту общего и полного ответа у пациентов с меланомой на поздних стадиях, что опосредовано изменениями в биопсиях опухоли, которые механистически коррелируют с гипотезой о том, что инъекция онколитического вируса талимогена лагерпарепвека изменяет микроокружение опухоли, привлекая Т-клетки, которые могут индуцировать системный ответ в отдаленных метастазах после последующей блокады PD-1 пембролизумабом. Фактически во время подготовительного периода с интратуморальным введением талимогена лагерпарепвека в качестве одного агента имелись доказательства системного увеличения циркулирующих CD4 и CD8 Т-клеток и увеличения проникновения CD8 Т-клеток в опухоли. Эти Т-клетки экспрессировали PD-1, и опухолевые клетки экспрессировали PD-L1, что, вероятно, ограничивало противоопухолевую активность одного агента талимогена лагерпарепвека, который выигрывал от блокады PD-1, что приводило к увеличению клинической активности, превышающей то, что можно было ожидать при любой монотерапии. Преимущество повышенных ответов достигалось при низкой степени токсичности, где большинство эффектов представляло ожидаемую токсичность, наблюдаемую при использовании каждого одного агента талимогена лагерпарепвека или пембролизумаба (Andtbacka R.H., Kaufman H.L., Collichio F., Amatruda T., Senzer N., Chesney J., Delman K.A., Spitler L.E., Puzanov I., Agarwala S.S. et al. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 33, 2780–2788; Ribas A., Hamid O., Daud A., Hodi F.S., Wolchok J.D., Kefford R., Joshua A.M., Patnaik A., Hwu W.J., Weber J.S. et al. (2016). Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA*, 315, 1600–1609).

[0303] Терапия на основе блокады PD-1 пембролизумабом или ниволумабом приводит к объективному ответу на уровне примерно 35–40% для пациентов с метастатической меланомой, не получавших лечение, т.е. без предшествующей терапии (Ribas et al., 2016; Robert C., Long G.V., Brady B., Dutriaux C., Maio M., Mortier L., Hassel J.C., Rutkowski P., McNeil C., Kalinka-Warzocha E. et al. (2015a). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.*, 372, 320–330; Robert C., Schachter J., Long G.V., Arance A., Grob J.J., Mortier L., Daud A., Carlino M.S., McNeil C., Lotem M. et al. (2015b). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J.*

Med., 372, 2521–2532). Не желая связываться с научной теорией, даже учитывая то, что необходимость выбора пациентов, у которых были доступные для инъекций очаги, могла исказить популяцию пациентов в этом исследовании, частота общего ответа 62% и частота полного ответа 33% вряд ли могла быть результатом применения только анти-PD-1 терапии. В исследовании, включавшем 655 пациентов, получавших лечение пембролизумабом, было 34 пациента с метастазами только в коже и лимфатических узлах (стадия M1a), и частота общего ответа в этой группе пациентов составила 38% (Ribas et al., 2016). В настоящее время проводится рандомизированное клиническое исследование в фазе 3, которое дополнительно демонстрирует, что комбинация более эффективна, чем один агент пембролизумаб или талимоген лагерпарепвек, по сравнению с системным введением пембролизумаба с интратуморальной инъекцией талимогена лагерпарепвека или плацебо (NCT 02263508).

[0304] Пациенты, у которых в исходных биопсиях была низкая плотность CD8+ Т-клеток, отсутствие значительной экспрессии гамма интерферона и низкая экспрессия PD-L1, вряд ли будут отвечать на терапию одним анти-PD-1 агентом (Ribas A., Robert C., Hodi F.S., Wolchok J.D., Joshua A.M., Hwu W.J., Weber J.S., Zarour H.M., Kefford R., Loboda A. et al. (2015). Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J. Clin. Oncol.*, 33, abstr 3001; Tumeh, P.C., Harview C.L., Yearley J.H., Shintaku I.P., Taylor E.J., Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu, V. et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515, 568–571). Следовательно, комбинированная терапия, описанная здесь, должна увеличить интратуморальную инфильтрацию CD8+ Т-клетками, которые могут привлекать достаточное количество Т-клеток со специфичностью к опухоли, что может реверсировать первичную резистентность к терапии блокадой PD-1 (Chen P.L., Roh W., Reuben A., Cooper Z.A., Spencer C.N., Prieto P.A., Miller J.P., Bassett R.L., Gopalakrishnan V., Wani K. et al. (2016). Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov.*, 6, 827–837; Ribas A. (2015). Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov.*, 5, 915–919). Данные, представленные здесь, демонстрируют, что талимоген лагерпарепвек может обеспечить такой комбинаторный эффект. В исследовании, представленном здесь, число пациентов, у которых опухоли имели низкую исходную плотность CD8+ и низкую сигнатуру интерферона гамма и, тем не менее, имели объективный ответ на комбинированную терапию, несомненно было выше по сравнению с предшествующим опытом с одним агентом пембролизумабом (Ribas et al., 2015; Tumeh P.C., Harview C.L., Yearley J.H., Shintaku I.P., Taylor E.J., Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu V. et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515, 568–571).

[0305] Доказательства того, что местное введение талимогена лагерпарепвека

вносило свой вклад в системный противоопухолевый эффект, обеспечивая усиление воспаления, наблюдаемого в опухолях, неинъецированных талимогеном лагерпарепвеком до введения пембролизумаба. Ориентировочно в двух из четырех недельных инъектированных очагов поражения на неделе 6 наблюдали повышенную плотность CD8+ и PD-L1 (иммуофлуоресцентный анализ) и в трех из пяти – повышенный уровень мРНК интерферона гамма.

[0306] Отсутствие необходимости в исходной инфильтрации опухоли будет дополнительно оценено в продолжающемся исследовании в фазе 3 комбинации талимогена лагерпарепвека плюс пембролизумаб, которое в настоящее время набирает 655 пациентов, где половина получает комбинацию и половина пембролизумаб с интратуморальным введением плацебо в контрольной группе (ClinicalTrials.gov, NCT02263508). Кроме того, для дальнейшей оценки системных эффектов талимогена лагерпарепвека проводится отдельное исследование биомаркеров для оценки исходных опухолей и опухолей после введения талимогена лагерпарепвека у более 100 пациентов (NCT02366195). Это обеспечит возможность последующего наблюдения за результатами небольшой выборки биопсий неинъецированных талимогеном лагерпарепвеком опухолей в данном исследовании, многие из которых показали усиление воспаления опухоли.

[0307] В заключение, высокий уровень ответа в фазе 1 данного клинического испытания и механистические изменения, зарегистрированные в биопсиях пациентов, указывают на то, что комбинация талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба может преодолеть некоторые ограничения монотерапии пембролизумабом или талимогеном лагерпарепвеком, и обеспечить проявление ответов у пациентов сверх того, что можно было бы ожидать при введении талимогена лагерпарепвека или пембролизумаба по отдельности.

Пример 9. Фаза 3 клинического испытания комбинации талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба

[0308] Фаза 3 исследования проводится с участием пациентов с ранее нелеченной, неоперабельной меланомой IIIB–IVM1c стадии для оценки эффективности талимогена лагерпарепвека с пембролизумабом по сравнению с плацебо с пембролизумабом, что оценивается по выживаемости без прогрессирования (PFS) (оценка ответа слепым независимым методом с использованием модифицированных Критериев оценки ответа солидных опухолей на лечение 1.1 (RECIST)) и общей выживаемости (OS) (фиг. 12). Субъектов рандомизируют 1:1 для получения следующих групп: (1) группа 1: талимоген лагерпарепвек плюс пембролизумаб; и (2) группа 2: плацебо плюс пембролизумаб.

[0309] Вторичные цели исследования в фазе 3 включают: (1) оценку эффективности талимогена лагерпарепвека с пембролизумабом по сравнению с плацебо с пембролизумабом, что оценивали по полному ответу, OS у субъектов, исключая стадию IVM1c, общему ответу, наилучшему общему ответу, долгосрочному ответу и уровню контроля заболевания; (2) оценку безопасности талимогена лагерпарепвека с пембролизумабом по сравнению с плацебо с пембролизумабом; и (3) оценку результатов,

о которых сообщают пациенты (PRO) в фазе 3, согласно Опроснику качества жизни, ядро 30 (QLQ-C30) Глобальный статус здоровья/качество жизни (GHS)/QoL) субшкала Европейской организации исследований и лечения рака (EORTC).

[0310] Рандомизация проводится по стадии заболевания: менее распространенные стадии (IIIB, IIIC и IVM1a) по сравнению с более распространенными стадиями (IVM1b и IVM1c) и предшествующей терапией ингибитором BRAF: без предшествующего ингибитора BRAF по сравнению с ингибитором BRAF с или без ингибитора MEK.

[0311] Ключевые критерии включения являются следующими: возраст мужчин или женщин ≥ 18 лет с гистологически подтвержденным диагнозом меланомы и IIIB–IVM1c стадии, для которых хирургическое вмешательство не было рекомендовано. Субъекты должны иметь поддающееся оценке заболевание и иметь возможность для введения в кожные, подкожные или узловые очаги. Субъекты должны иметь общее состояние здоровья согласно критериям Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0 или 1, а также адекватные гематологические показатели, показатели функции печени и почек, и показатели свертываемости крови. Субъекты должны быть наивными в отношении лечения (не должны были получать какое-либо предшествующее системное противоопухолевое лечение, включающее химиотерапию, иммунотерапию или таргетную терапию), назначаемого в неадьювантном варианте. Субъекты с мутациями опухолей BRAF могут получать лечение ингибиторами BRAF по отдельности или в комбинации с ингибитором MEK в качестве единственной предшествующей системной терапии.

[0312] Ключевые критерии исключения являются следующими: отсутствие активных церебральных метастазов и/или карциноматозного менингита; субъекты не должны иметь увеальную меланому или меланому слизистых оболочек. Субъекты не должны иметь истории состояний иммунодефицита. Субъекты не должны были получать предварительное лечение талимогеном лагерпарепвеком, любыми другими онколитическими вирусами, пембролизумабом или любым другим ингибитором PD-1, PD-L1 или лиганда 2 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L2). Субъекты не должны иметь истории симптоматических аутоиммунных заболеваний. Субъекты не должны иметь активных герпетических поражений кожи или предшествующих осложнений герпетической инфекции, и для них не должно требоваться периодическое или длительное лечение антигерпетическим препаратом.

Лечение талимогеном лагерпарепвеком/плацебо

[0313] Первый цикл талимогена лагерпарепвека или плацебо составляет 21 (+3) день. Последующие циклы следует назначать раз в 2 недели (± 3) дня до недели 9 и затем раз в 3 недели (± 3) дня. В день 1 цикла 1 первая доза талимогена лагерпарепвека составляет до 4,0 мл с 10^6 БОЕ/мл или плацебо. Вторую инъекцию в количестве до 4,0 мл с 10^8 БОЕ/мл следует вводить через 21 (+3) день после первоначальной инъекции (т.е. не ранее, чем на день 22, но не следует откладывать более чем на 3 дня после 21-дневного периода). Талимоген лагерпарепвек/плацебо следует вводить до исчезновения инъецированных очагов, полного ответа, документально подтвержденного

прогрессирующего заболевания согласно iRC–RECIST, непереносимости исследуемого лечения, 24 месяца от даты первого введения талимогена лагерпарепвека/плацебо или до конца исследования, в зависимости от того, что наступает раньше. Интервал между циклами лечения может быть увеличен за счет проявления токсичности. Когда в один и тот же день вводят инъекции талимогена лагерпарепвека или плацебо, и пембролизумаба, то следует сначала вводить талимоген лагерпарепвек или плацебо, если это возможно.

Лечение пембролизумабом

[0314] Пембролизумаб в дозе 200 мг вводят внутривенно раз в 3 недели (± 3 дня). Вторую дозу пембролизумаба вводят через 21 (+3) день после начальной дозы. Интервал между циклами лечения может быть увеличен за счет проявления токсичности. Когда талимоген лагерпарепвек и пембролизумаб вводят в один и тот же день, то талимоген лагерпарепвек следует вводить первым, если это возможно. Дозирование пембролизумаба продолжается до тех пор, пока не будет подтверждено прогрессирующее заболевание (PD) согласно критериям iRC–RECIST, непереносимость лечения, 24 месяца от даты первой дозы пембролизумаба или до конца исследования, в зависимости от того, что наступит раньше. Прекращение лечения может быть рассмотрено для субъектов, которые получили подтвержденный полный ответ (CR), которые получали пембролизумаб в течение, по меньшей мере, 24 недель и имели, по меньшей мере, 2 курса лечения пембролизумабом после даты, когда был зарегистрирован первоначальный CR.

Пример 10. Фаза 1b клинического испытания комбинации талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба у пациентов с рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

[0315] Фаза 1b (MASTERKEY232; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02626000) была разработана для пациентов с рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи (SCCHN), с применением комбинированной терапии инъекцией талимогена лагерпарепвека в очаг и системного введения пембролизумаба. Первичная цель состояла в том, чтобы оценить безопасность этой комбинации, и вторичные цели включали оценку иммунных опухолевых реакций.

[0316] У выбранных пациентов, в возрасте 18 лет или старше, была гистологически подтвержденная метастатическая или рецидивирующая SCCHN ротовой полости, ротоглотки, гипотаринкса или гортани, и это заболевание считалось неоперабельным и не поддающимся лечению лучевой терапией, и измеряемые проявления заболевания подходили для инъекции в очаг поражения (> 1 кожная, подкожная или узловатая опухоль SCCHN > 10 мм, самого большого диаметра, отдельно или в совокупности). Выбранные пациенты имели прогрессирование или рецидив заболевания после лечения платиносодержащей терапией. Пациенты должны были иметь адекватное общее состояние здоровья и гематологические показатели, показатели функции печени и почек, и показатели свертываемости крови. Пациентов исключали из исследования, если у них были активные метастазы в ЦНС и/или карциноматозный менингит, первичная карцинома носоглотки, или они подвергались риску нарушения функции дыхательных путей за счет

отека/воспаления после инъекции в опухоль, и если ранее они получали талимоген лагерпарепвек, пембролизумаб или другую анти-PD-1 терапию. Все пациенты дали письменное информированное согласие. Процедуры обучения были утверждены комитетом по этике в каждом центре.

Дизайн исследования

[0317] Данное исследование в фазе 1b представляло собой открытое многоцентровое исследование с одной группой, в котором в основном оценивали безопасность введения талимогена лагерпарепвека в очаг в сочетании с внутривенным введением пембролизумаба. Тридцать шесть пациентов получали талимоген лагерпарепвек и пембролизумаб, из которых первые 16 пациентов участвовали в анализе DLT.

[0318] Первую дозу введения талимогена лагерпарепвека в очаг поражения до 8,0 мл с 10^6 БОЕ/мл вводили на день 1 недели 1. Последующие дозы вводили до 8,0 мл с 10^8 БОЕ/мл раз в 3 недели. До 4 мл (общий объем) талимогена лагерпарепвека можно было вводить инъекцией в очаг при каждом визите во время лечения. Объем, вводимый в каждый очаг, зависел от диаметра очага. Инъецированный объем в очаг варьировался от 0,1 мл для поражений $\leq 0,5$ см до 4,0 мл для поражений > 5 см при самом большом диаметре. Введение талимогена лагерпарепвека продолжали до исчезновения инъецированных очагов, получения полного ответа (CR), подтвержденного прогрессирования заболевания (PD) согласно иммунологическим критериям оценки ответа на лечение солидных опухолей (iRECIST), по причине непереносимости лечения, до 24 месяцев после первой дозы пембролизумаба или до конца исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Пембролизумаб (200 мг) вводили внутривенно раз в 3 недели, начиная со дня 1 недели 1 (после начальной дозы талимогена лагерпарепвека в тот же день). Лечение пембролизумабом должно было продолжаться до достижения iCR, подтвержденного iPD, непереносимости лечения, 24 месяца с даты первой дозы пембролизумаба или окончания исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Первичной конечной точкой была частота случаев токсичности, ограничивающей дозу (DLT), начиная с момента, когда оба препарата вводили в комбинации. Случаи DLT у первых 16 оцениваемых пациентов и дополнительные данные о безопасности анализировались экспертной группой по уровням доз (DLRT). Период оценки DLT составлял 6 недель от введения начальной дозы обоих исследуемых способов лечения. Для оценки DLT пациенты должны были получить 2 дозы талимогена лагерпарепвека и 2 дозы пембролизумаба в комбинации или иметь DLT после как минимум 1 дозы талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба в комбинации. Вторичные конечные точки включали следующие связанные с иммунитетом опухолевые реакции для каждого исследователя с использованием критериев irRECIST: частота объективного ответа (iORR; полный ответ+частичный ответ), частота полного ответа (iCRR), наилучший общий ответ (iBOR), продолжительность ответа (iDOR), частота контроля заболевания (iDCR) и выживаемость без прогрессирования заболевания (iPFS).

[0319] Первичным анализом для фазы 1b клинического испытания была оценка ответа опухоли, которую завершали, когда последний включенный в исследование субъект имел возможность завершить оценку ответа в течение 9 недель.

Исходные демографические данные и характеристики

[0320] В фазе 1b клинического испытания 36 пациентам с рецидивирующей или метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи вводили интратуморально талимоген лагерпарепвек и внутривенно пембролизумаб. Исходные демографические и клинические характеристики приведены в таблице 5.

[0321]

Таблица 5

Исходные демографические данные и характеристики

	талимоген лагерпарепвек+пембролиз умаб (N=36)
Пол – n(%)	
Мужчины	29 (80,6)
Женщины	7 (19,4)
Средний (диапазон) возраст, у	62 (35–77)
Статус работоспособность ECOG status, n(%)	
0	9 (25)
1	27 (75)
Исходный статус HSV, n (%)	
Негативный	5 (13,9)
Положительный	22 (61,1)
Неизвестный	9 (25,0)
Первичное место опухоли, n(%)	
Ротоглотка	9 (25,0)
Гортань	4 (11,1)
Ротовая полость	20 (55,6)
Гипофаринкс	3 (8,3)
Статус PD–L1 – n (%)	
Положительный	28 (77,8)
Неположительный	3 (8,3)
Неопределенный	3 (8,3)
Отсутствующий	2 (5,6)

Токсичность, ограничивающая дозы, безопасность и переносимость комбинации талимогена лагерпарепвека с пембролизумабом

[0322] Шестнадцать пациентов были включены в фазу 1b оценки токсичности, ограничивающей дозу. Из этих 16 пациентов у одного наблюдали DLT (6,3%) с артериальным кровотечением 5 степени (смертельным исходом). За счет этого показателя DLT, равного 6,3%, в фазу 1b части исследования было включено еще 20 пациентов.

[0323] Тридцать шесть пациентов в фазе 1b исследования получали, по меньшей мере, одну дозу интратуморально талимогена лагерпарепвека и, по меньшей мере, одну дозу внутривенно пембролизумаба в комбинации. Не было никаких неожиданных результатов в отношении безопасности, и побочные эффекты соответствовали тем, которые наблюдают при монотерапии талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом. Появление нежелательных явлений, возникающих при лечении, 3 степени или выше, было зарегистрировано у 5 (13,9%) пациентов, которые, как полагали, были связаны с талимогеном лагерпарепвеком, и у 3 (8,3%) пациентов были связаны с пембролизумабом. Из этих возникших нежелательных явлений 3 степени или выше при лечении 2 (5,6%) привели к прекращению введения талимогена лагерпарепвека, и у 1 (2,8%) привело к прекращению введения пембролизумаба. В ходе исследования было сообщено о семи смертельных случаях, включая пациента с DLT (артериальное кровотечение), которое считалось связанным с талимогеном лагерпарепвеком, и смертельные исходы, связанные с пембролизумабом, отсутствовали. Наиболее частыми побочными эффектами, возникающими при лечении, были гипертермия (36,1%), одышка (33,3%) и утомляемость (25,0%).

Противоопухолевая активность с использованием комбинации талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба

[0324] Первичный анализ фазы 1b испытания проводили, когда последний зарегистрированный субъект имел возможность завершить оценку ответа в течение 9 недель. Первичными конечными точками эффективности были: частота объективного ответа (iORR), частота полного ответа (iCRR), наилучший общий ответ (iBOR), продолжительность ответа (iDOR) и частота контроля заболевания (iDCR) (оценка ответа исследователем с использованием иммунологических критериев оценки ответа солидных опухолей на лечение [irRECIST]). Согласно irRECIST, наблюдения iCR, iPR и iPD требуют подтверждающего сканирования не менее чем через 28 дней после первоначального наблюдения ответа, чтобы считаться подтвержденным в анализе ответа.

[0325] Из 36 пациентов, включенных в исследование, 28 (77,8%) имели подтвержденные PD-L1–положительные опухоли, 5 (13,9%) были HPV–положительными, и 13 (36,1%) были HPV–отрицательными, 18 (50%) неизвестными (таблица 6). Неподтвержденная частота объективного ответа (полные и частичные ответы) согласно iRECIST составила 16,7% (95% CI, 6,4%–32,8%) с подтвержденным значением iORR 11,1% (95% CI, 3,1%–26,1%). Неподтвержденные и подтвержденные показатели контроля заболевания (полное, частичное и стабильное заболевание) согласно iRECIST составили 38,9% (95% CI, 23,1%–56,5%). Длительное последующее наблюдение все еще продолжалось во время первичного анализа.

[0326]

Таблица 6

Наилучший общий ответ

Наилучший общий ответ (iBOR)	Талимоген лагерпарепвек и пембролизумаб	
	Неподтвержденный (N=36) n(%)	Подтвержденный (N=36) n(%)
iORR (iCR/iPR) 95% CI ^b	6 (16,7) (6,4, 32,8)	4 (11,1) (3,1, 26,1)
iCR	0 (0,0)	0 (0,0)
iPR	6 (16,7)	4 (11,1)
iSD	8 (22,2)	10 (27,8)
iPD	11 (30,6)	6 (16,7)
iUE	1 (2,8)	6 (16,7)
ND	10 (27,8)	10 (27,8)
iDCR (iCR/iPR/iSD) 95% CI ^b	14 (38,9) (23,1, 56,5)	14 (38,9) (23,1, 56,5)

[0327] ^aСогласно irRECIST, наблюдения iCR, iPR и iPD требуют подтверждающего сканирования не менее чем через 28 дней после исходного наблюдения ответа для того, чтобы считаться подтвержденным в анализе ответа

[0328] ^bБиномиальная пропорция с точным 95% доверительным интервалом (CI)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения опухоли у субъекта, включающий:

выбор субъекта, имеющего опухоль, имеющую плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм²;

введение талимогена лагерпарепвека субъекту; и

введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту.

2. Способ по п.1, где опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов интерферона гамма (IFN γ) до введения по сравнению с заранее установленным порогом контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 (STAT1), СС-рецептора хемокина типа 5 (CCR5), лиганда 9 хемокина (мотив С–Х–С) (CXCL9), перфорина 1 (PRF1), HLA–DRA, лиганда 10 хемокина (мотив С–Х–С) (CXCL10), лиганда 11 хемокина (мотив С–Х–С) (CXCL11), индоламин–2,3–диоксигеназы 1 (IDO1) и гранзима А (GZMA).

3. Способ по п.1, где опухоль не экспрессирует сигнатурные гены IFN γ до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

4. Способ по п.1, где опухоль имеет статус лиганда 1 белка запрограммированной смерти (PD–L1) ниже чем примерно 50% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

5. Способ по п.1, где опухоль имеет статус PD–L1 ниже чем примерно 1% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

6. Способ по п.1, где талимоген лагерпарепвек вводят субъекту интратуморально и/или пембролизумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту системно.

7. Способ по п.1, где субъект имеет рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рак желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы.

8. Способ по п.7, где:

меланома представляет собой кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому;

рак молочной железы представляет HER2⁺ рак молочной железы, HER2–HR⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы;

рак предстательной железы является кастрационно–резистентным раком предстательной железы;

рак мочевого пузыря представляет переходноклеточный рак или уротелиальный рак;

рак головы и шеи представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи; и/или

саркома представляет саркому мягких тканей или саркому кости.

9. Способ по п.1, где опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1000 клеток/мм².

10. Способ лечения опухоли у субъекта, которая слабо отвечает или не отвечает на монотерапию пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом, включающий:

введение талимогена лагерпарепвека субъекту; и

введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту.

11. Способ по п.10, где:

опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток/мм² до введения;

опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов интерферона гамма (IFN γ) до введения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA; и/или

опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

12. Способ лечения опухоли у субъекта, которая прогрессировала во время монотерапии пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом, включающий:

введение субъекту талимогена лагерпарепвека; и

введение субъекту пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента

13. Способ по п.12, где:

опухоль имеет плотность инфильтрации CD8⁺ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600, или примерно 500 клеток/мм² до введения;

опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до введения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA; и/или

опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до введения талимогена лагерпарепвека и пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

14. Способ лечения опухоли, имеющей плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм², включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

15. Способ по п.14, где опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рак предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы.

16. Способ по п.15, где:

меланома представляет собой кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому; и/или

рак головы и шеи представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи.

17. Способ по п.14, где опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до контактирования, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA.

18. Способ по п.14, где опухоль имеет статус PD-L1 ниже, чем примерно 50% до контактирования с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

19. Способ лечения опухоли, экспрессирующей более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до лечения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

20. Способ по п.19, где опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы.

21. Способ по п.20, где:

меланома представляет собой кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому; и/или

рак головы и шеи представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи.

22. Способ по п.19, где опухоль имеет плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм² до контактирования.

23. Способ по п.19, где опухоль имеет статус PD-L1 ниже чем примерно 50% до контактирования с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

24. Способ лечения опухоли, имеющей статус PD-L1 ниже чем около 50%, до лечения, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

25. Способ по п.24, где опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желевывыводящих путей и рака поджелудочной железы.

26. Способ по п.25, где:

меланома представляет кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому; и/или

рак головы и шеи представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи.

27. Способ по п.24, где опухоль имеет плотность инфильтрации CD8+Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм² до контактирования.

28. Способ по п.24, где опухоль экспрессирует более низкие уровни двух, трех, четырех или пяти сигнатурных генов IFN γ до контактирования, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9, PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA.

29. Способ лечения опухоли, имеющей плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700 примерно 600 или примерно 500 клеток/мм², и экспрессирующей более низкие уровни пяти или менее сигнатурных генов IFN γ до лечения, чем заранее установленный порог контрольной панели сигнатурных генов, выбранных из группы, состоящей из IFN γ , STAT1, CCR5, CXCL9,

PRF1, HLA-DRA, CXCL10, CXCL11, IDO1 и GZMA, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

30. Способ по п.29, где опухоль происходит от субъекта, имеющего рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы.

31. Способ по п.30, где:

меланома представляет кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому; и/или

рак головы и шеи представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи.

32. Способ по п.29, где опухоль имеет статус PD-L1 ниже чем примерно 50% до контактирования с талимогеном лагерпарепвеком и пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом.

33. Способ лечения опухоли, ранее резистентной к пембролизумабу, варианту пембролизумаба или его антигенсвязывающему фрагменту, у субъекта, затем подвергнутой воздействию талимогена лагерпарепвека, включающий введение субъекту пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента.

34. Способ по п.33, где субъект имеет рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, саркомы, почечноклеточного рака, рака желудка, рака пищевода, рака анального канала, рака желчевыводящих путей и рака поджелудочной железы.

35. Способ по п.34, где:

меланома представляет кожную меланому, метастатическую меланому или увеальную меланому; и/или

рак головы и шеи представляет рецидивирующую или метастатическую плоскоклеточную карциному головы и шеи.

36. Способ визуализации опухоли, резистентной к монотерапии пембролизумабом, вариантом пембролизумаба или его антигенсвязывающим фрагментом, у субъекта, чувствительного к пембролизумабу, варианту пембролизумаба или его антигенсвязывающему фрагменту, включающий контактирование опухоли с талимогеном лагерпарепвеком.

37. Способ по п.36, где образец опухоли, отобранный у субъекта после контактирования опухоли с талимогеном лагерпарепвеком, имеет повышенный уровень одной или любой комбинации CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, IFN γ , CD20⁺ В-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток и CD56⁺ клеток относительно образца опухоли,

отобранного до контактирования опухоли с талимогеном лагерпарепвеком.

38. Способ по п.36, где опухоль имеет плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками более 1000 клеток/мм² после контактирования с талимогеном лагерпарепвеком.

39. Способ лечения опухоли у субъекта, включающий:

выбор субъекта, имеющего опухоль, имеющую плотность инфильтрации CD8+ Т-клетками ниже чем примерно 1500, примерно 1400, примерно 1300, примерно 1200, примерно 1100, примерно 1000, примерно 900, примерно 800, примерно 700, примерно 600 или примерно 500 клеток/мм²;

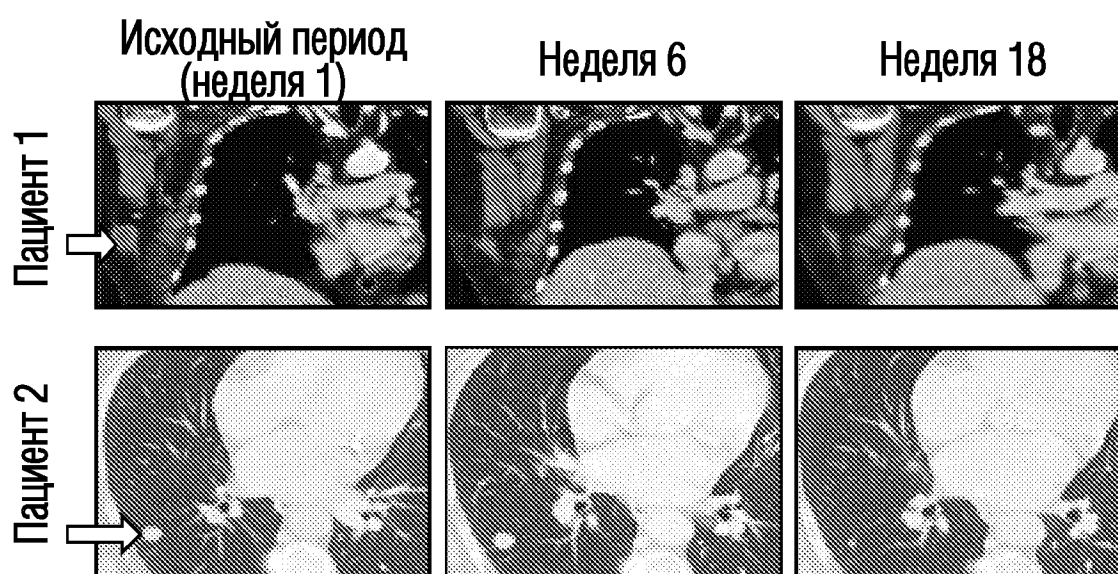
введение талимогена лагерпарепвека субъекту интратуморально в виде начальной дозы с последующей одной или несколькими вторичными дозами; и

системное введение пембролизумаба, варианта пембролизумаба или его антигенсвязывающего фрагмента в виде начальной дозы с последующей одной или несколькими вторичными дозами.

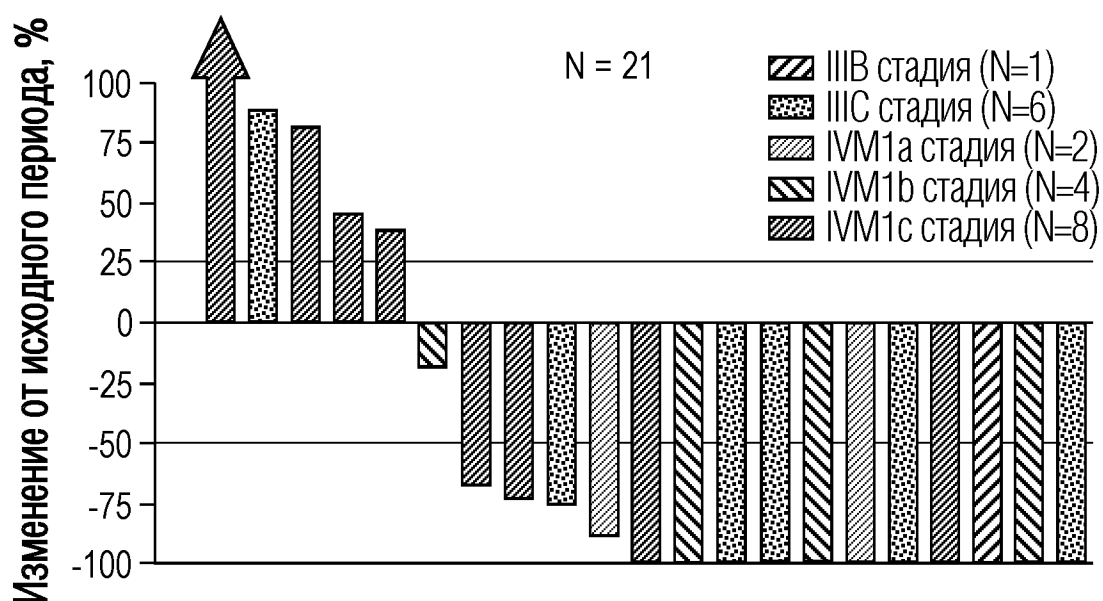
1/29



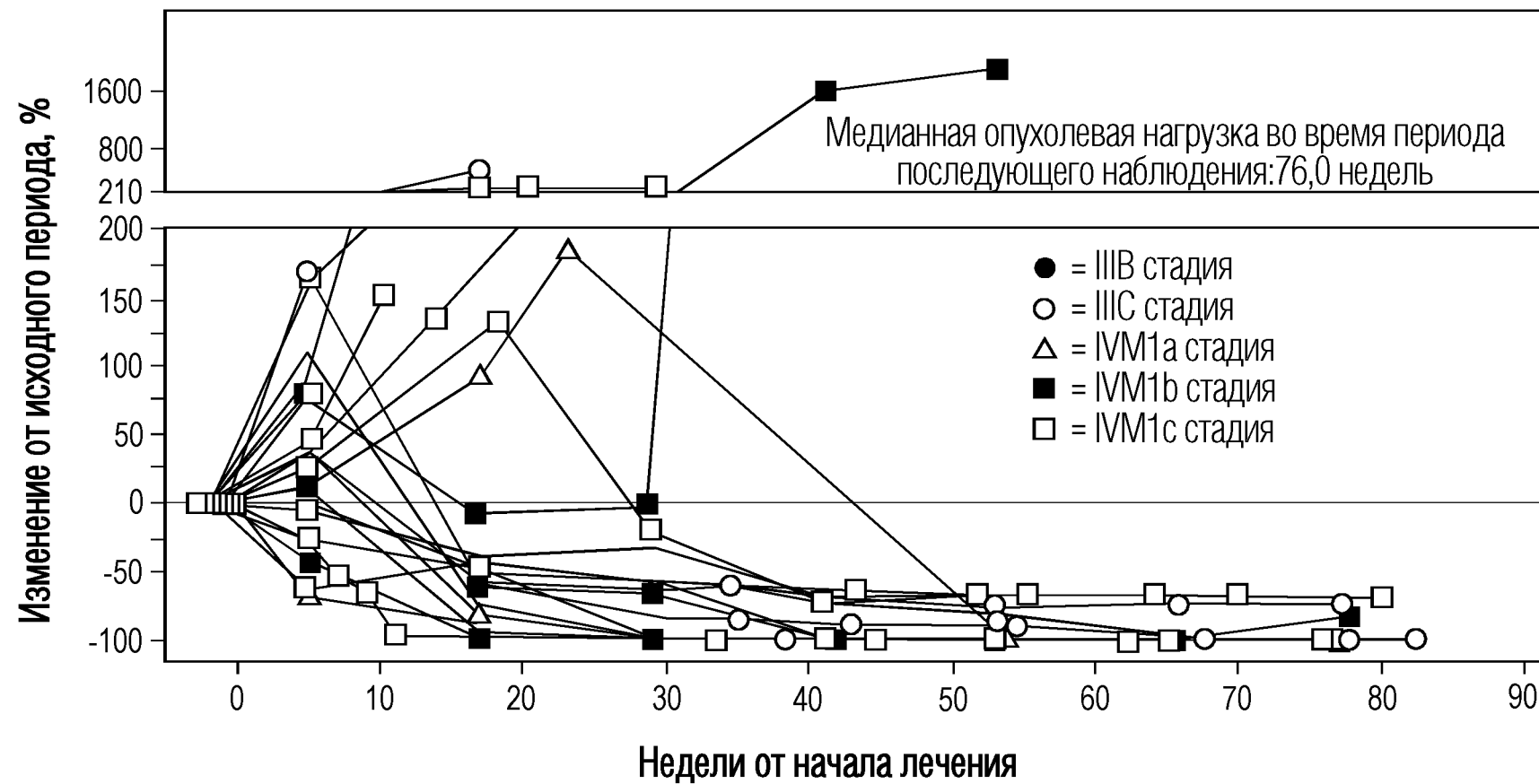
ФИГ. 1А



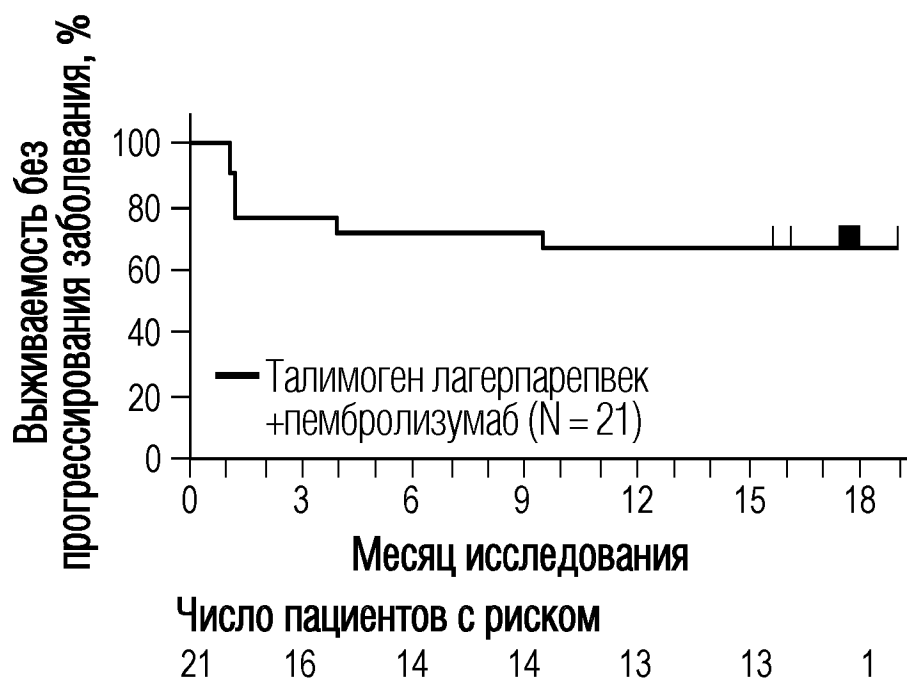
ФИГ. 1В



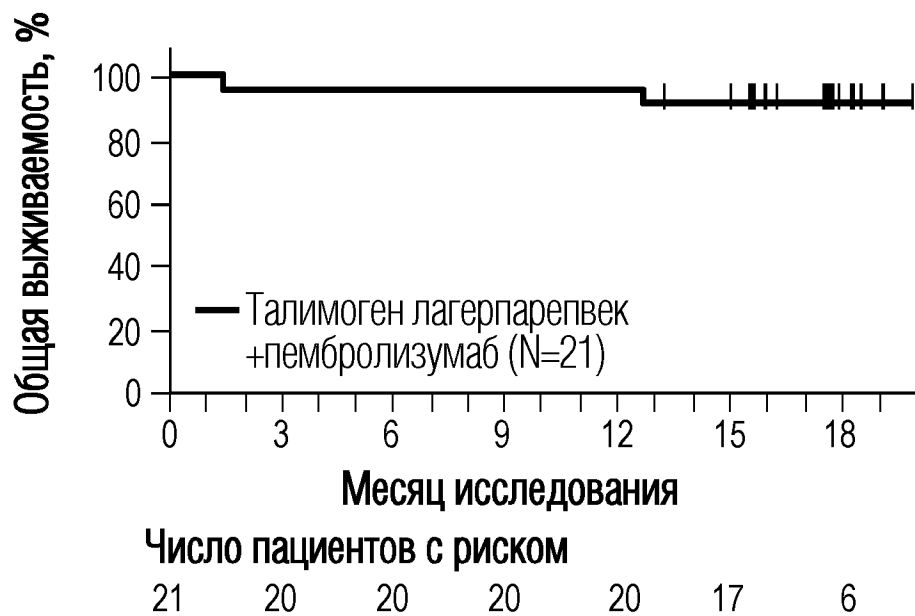
ФИГ. 1С



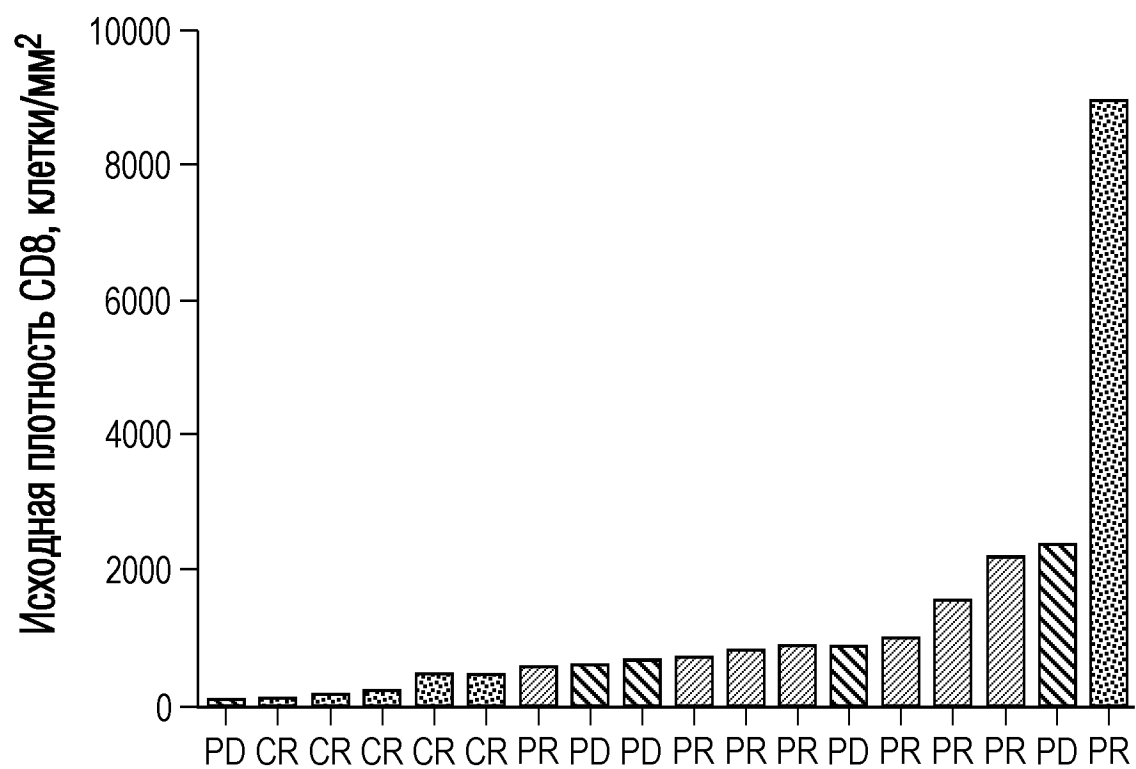
ФИГ. 1D



ФИГ. 1Е



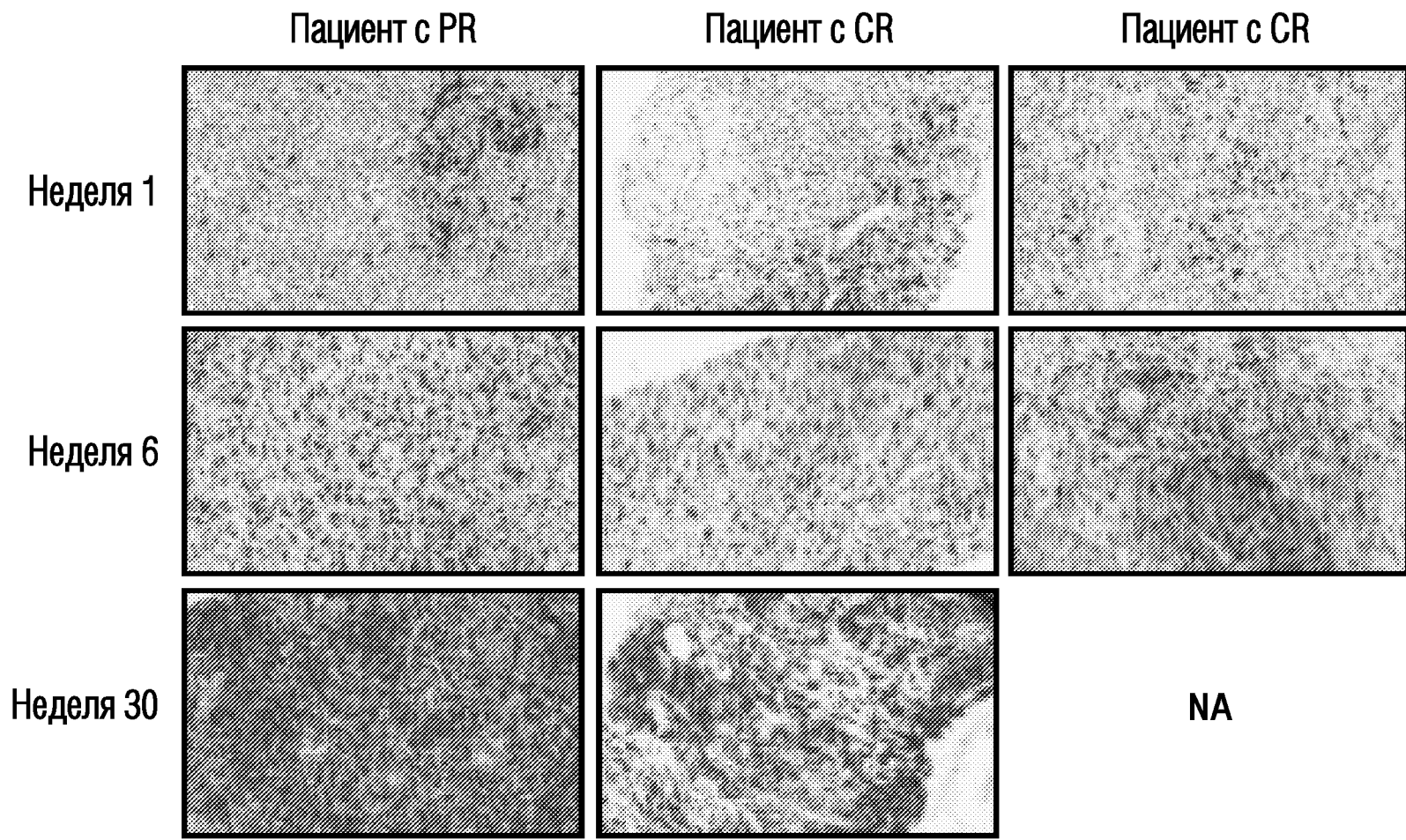
ФИГ. 1F



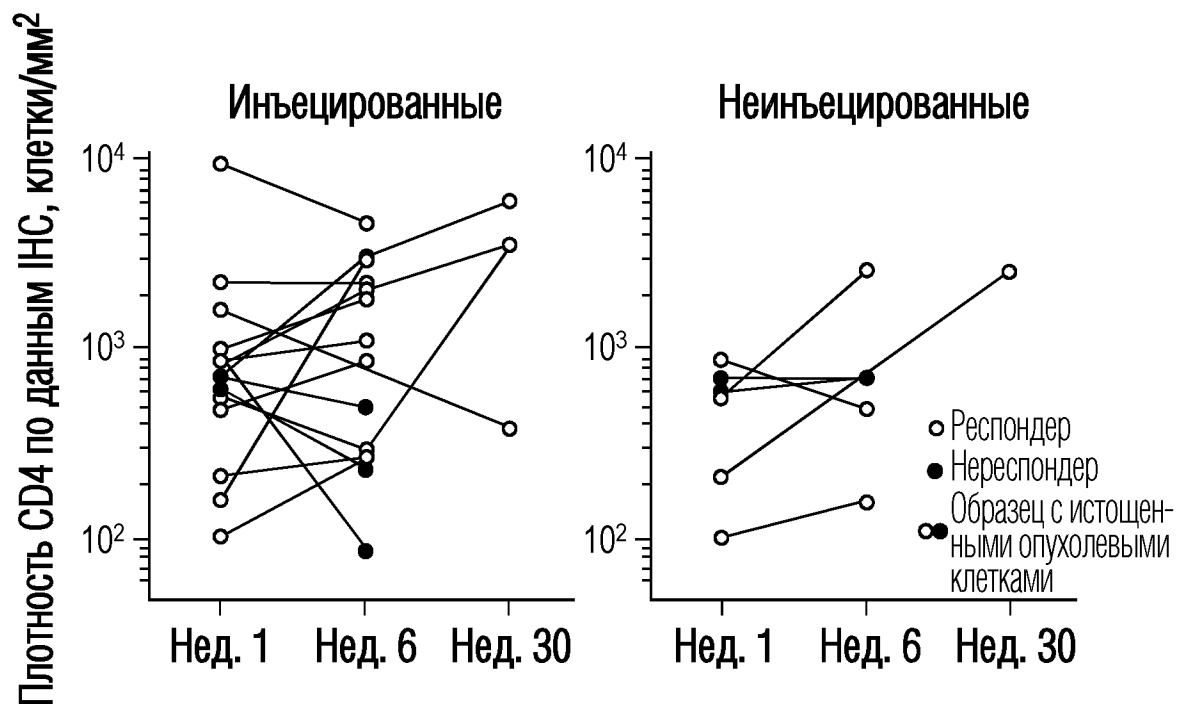
ФИГ. 2А

PD-L1	+	NA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Оценка IFN γ	+	NA	-	-	-	NA	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

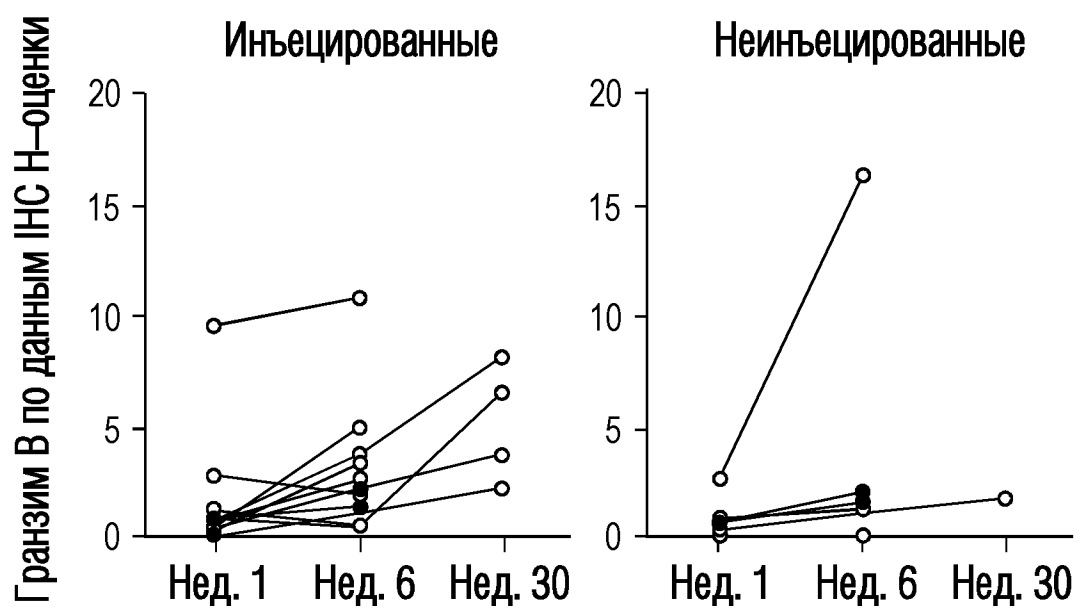
ФИГ. 2В



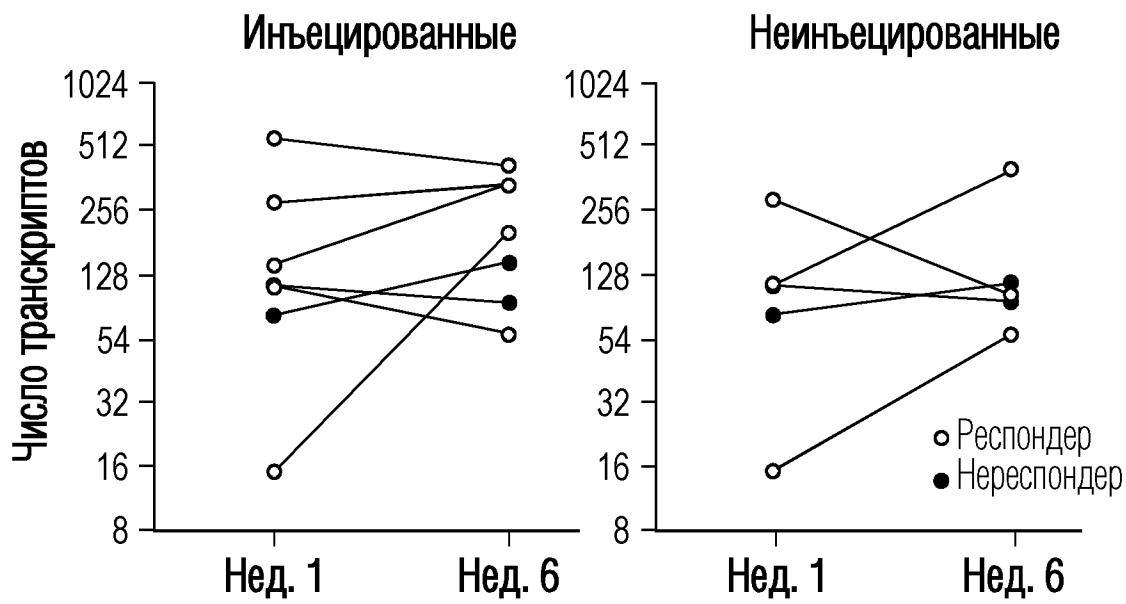
ФИГ. 3А



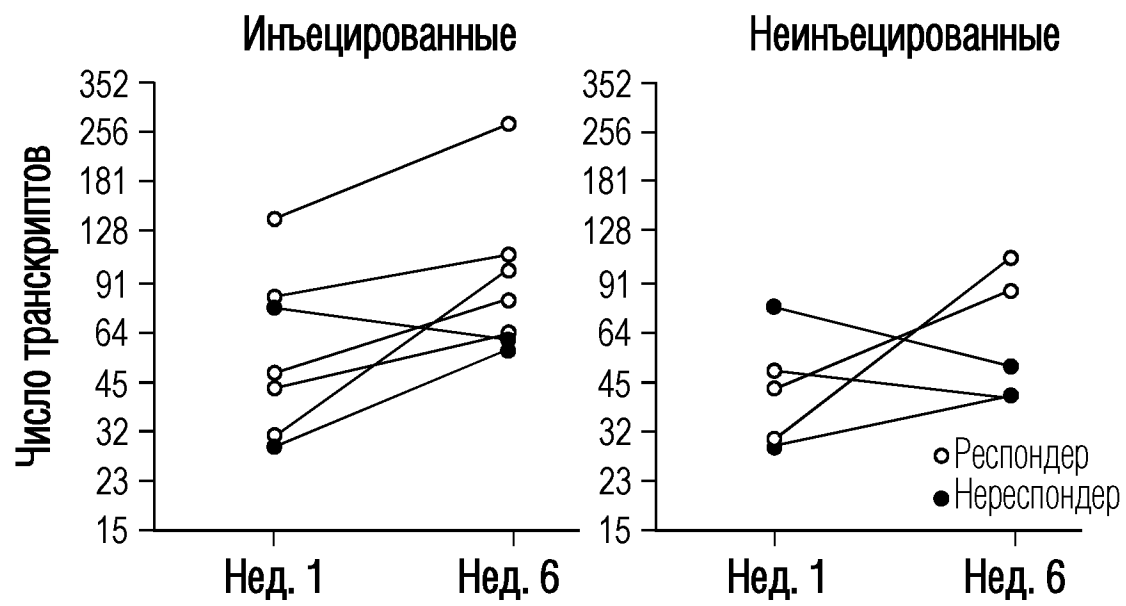
ФИГ. 3В



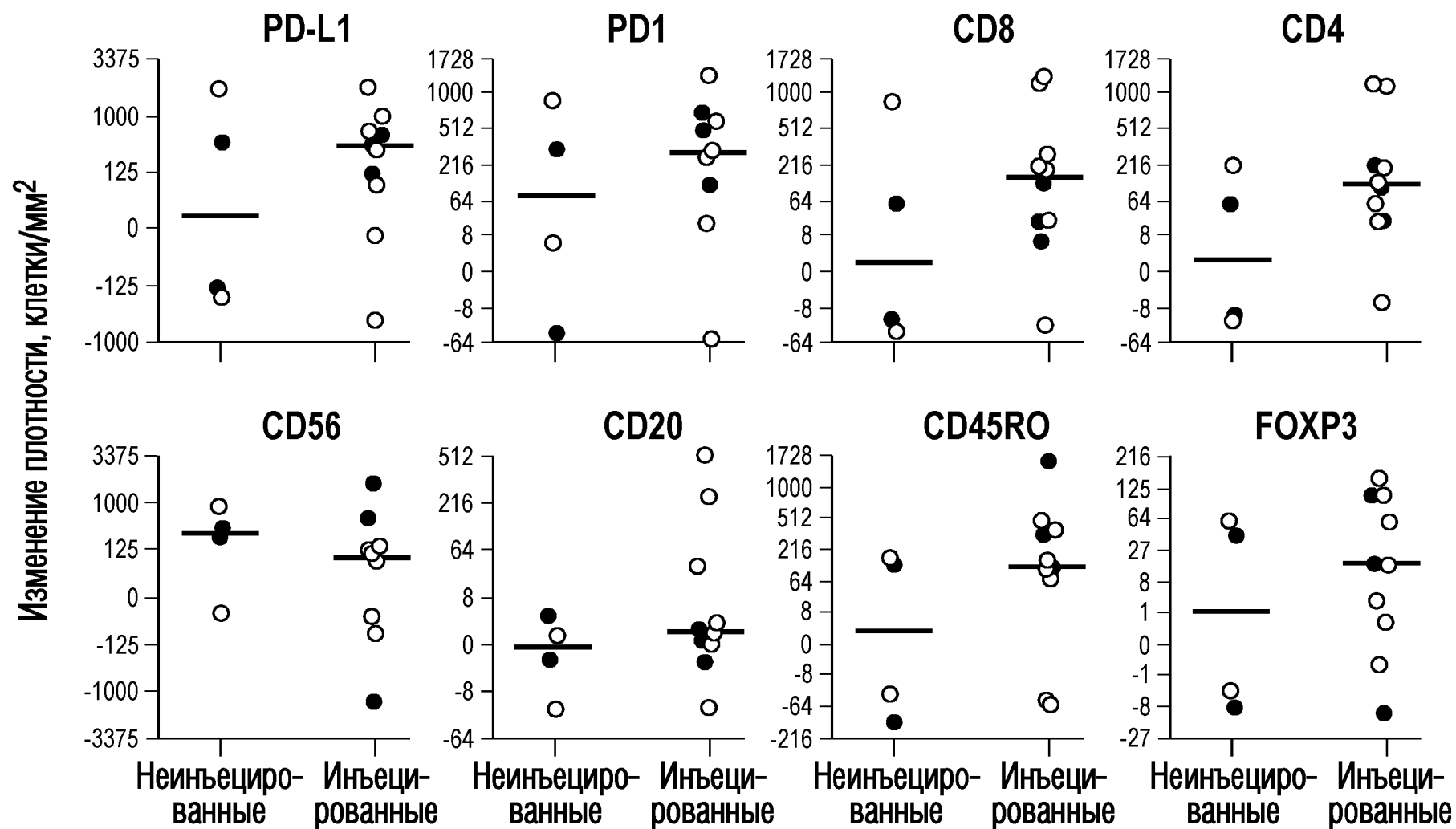
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

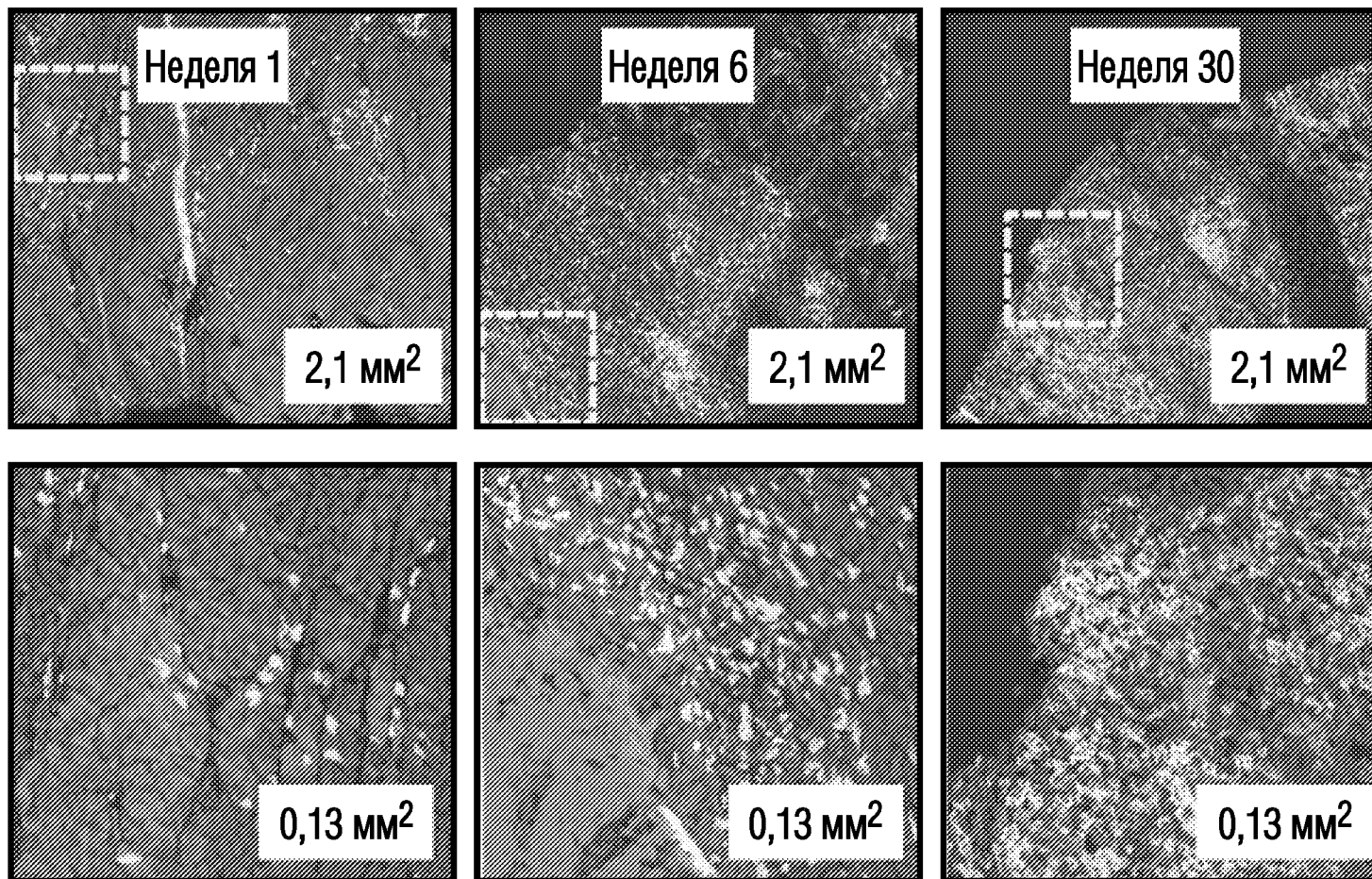


ФИГ. 3Е



ФИГ. 4А

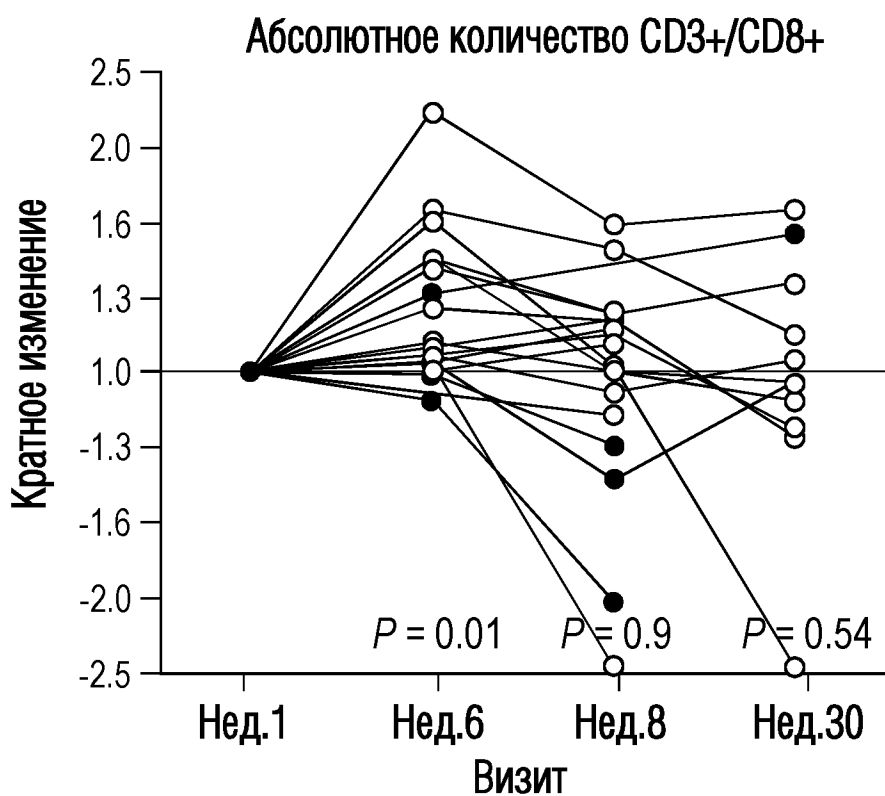
PD-L1 CD8 S100



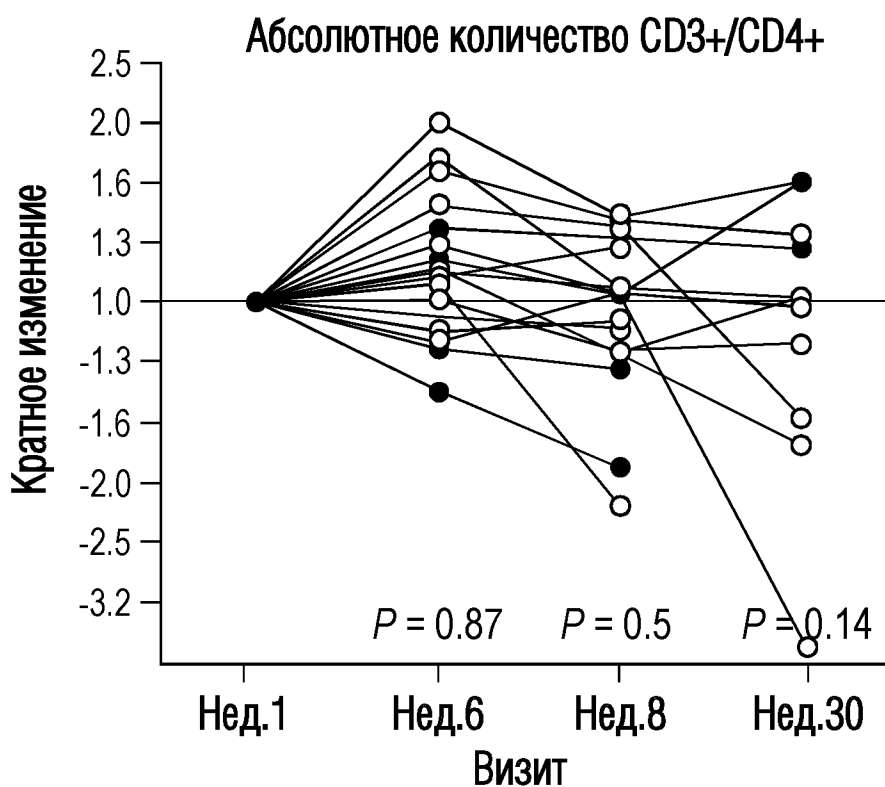
ФИГ. 4В

Нед. 6

10/29

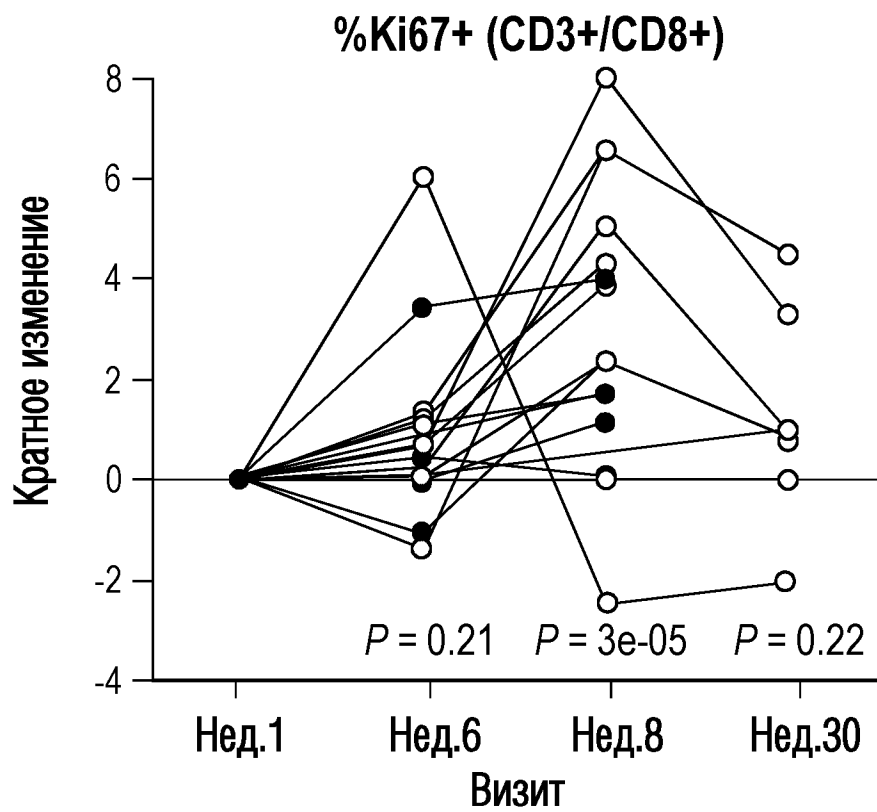


ФИГ. 5А

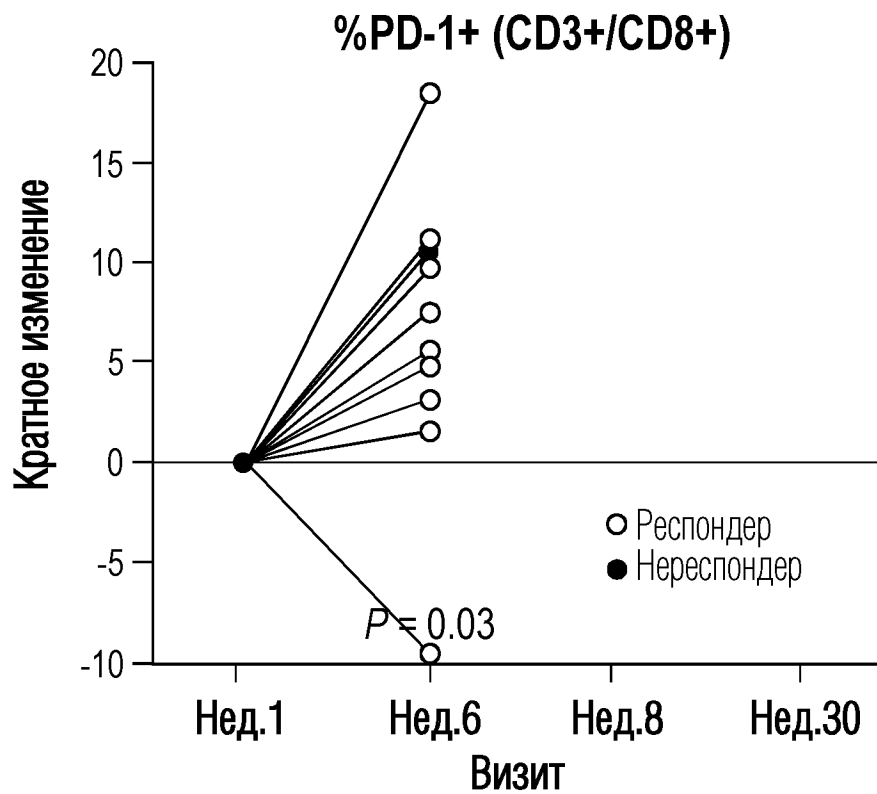


ФИГ. 5В

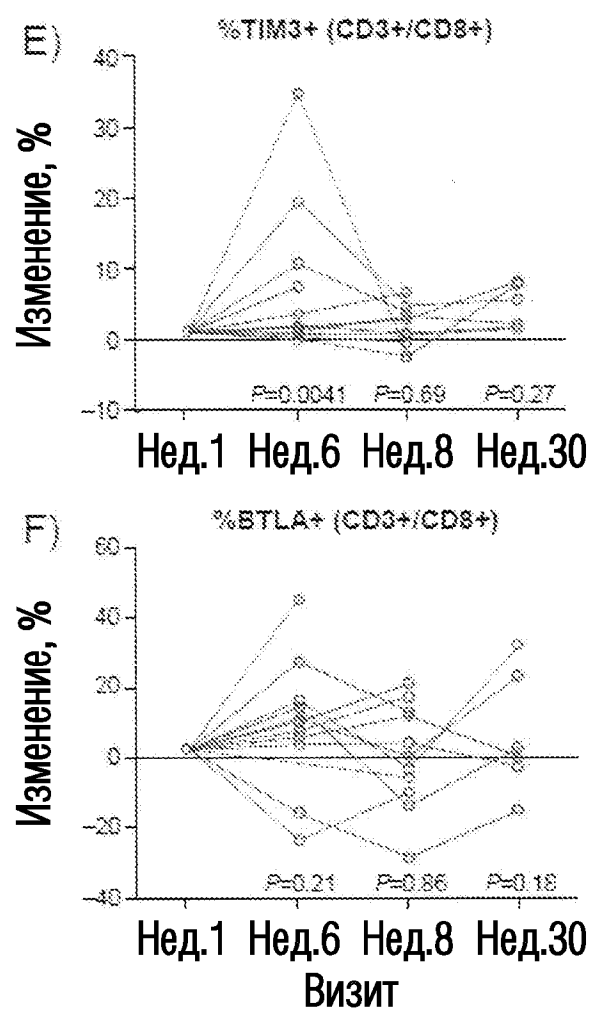
11/29



ФИГ. 5С

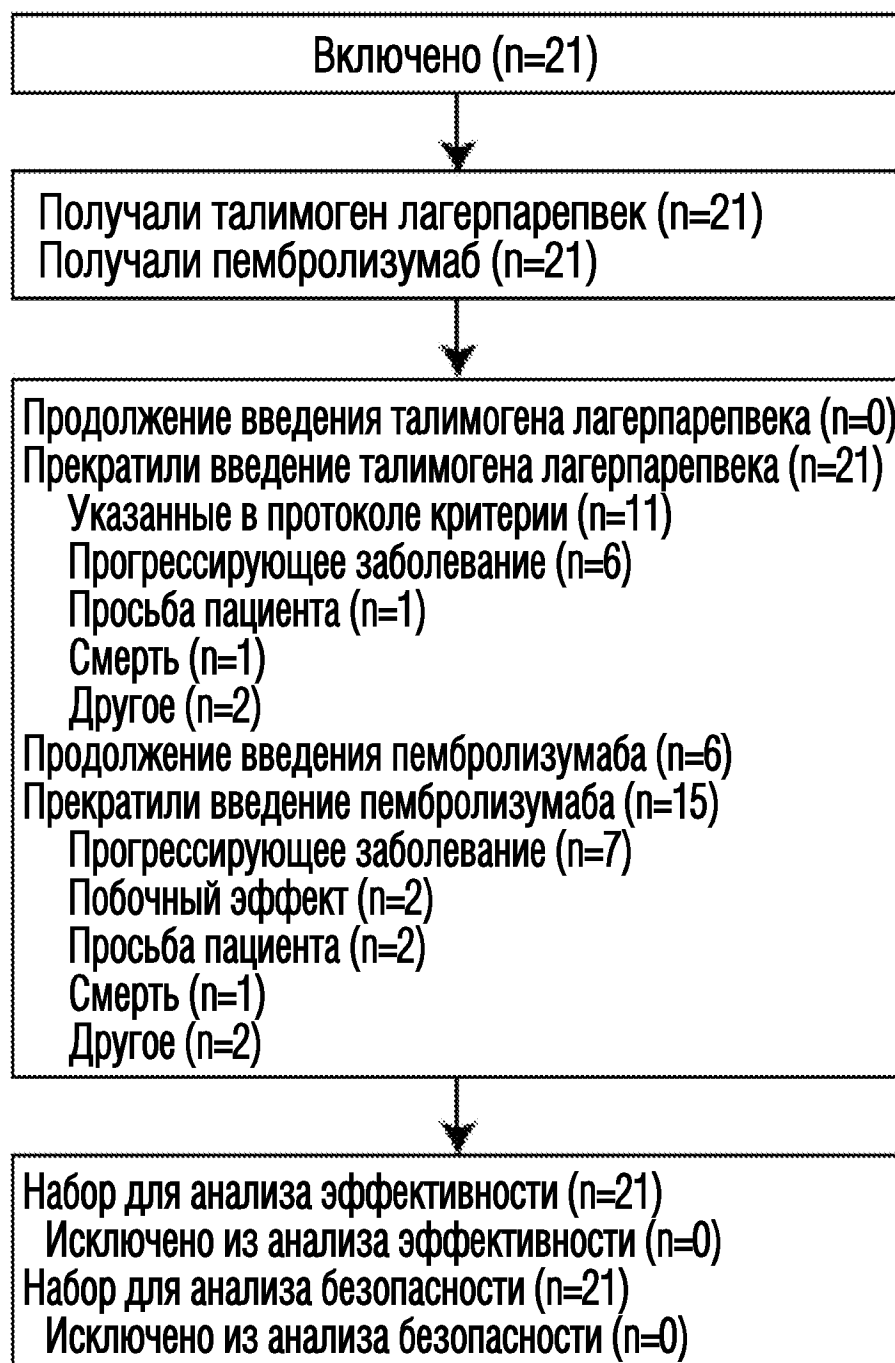


ФИГ. 5D



ФИГ. 5

Распределение пациентов, включенных в исследование



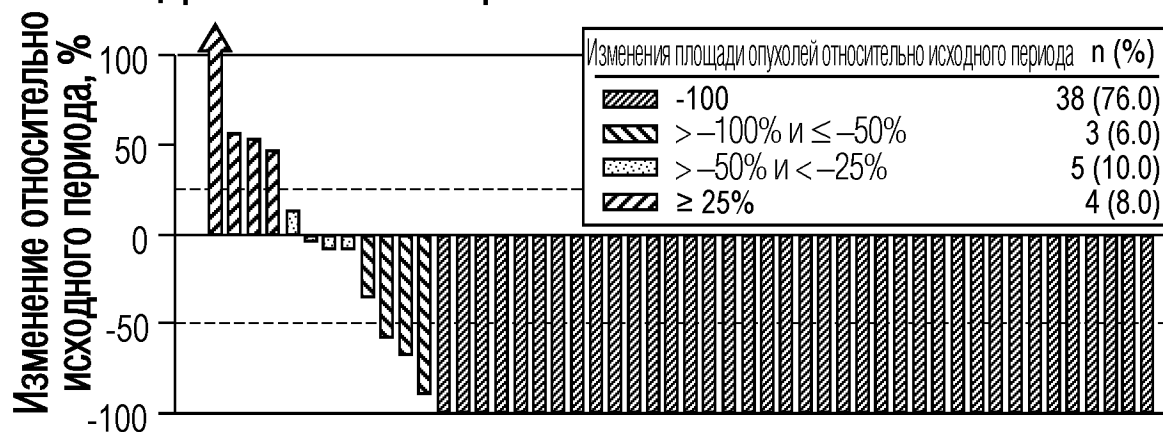
ФИГ. 6А

Количество пациентов, для которых доступны результаты по биомаркерам

Анализ	Неделя -5 Исходный период	Неделя 0 Инъецированные	Неделя 0 Неинъецированные	Неделя 24 Инъецированные	Неделя 24 Неинъецированные
IHC PD-L1	23	10	4	6	1
IHC CD8, GZMB					
В целом	19	15	5	4	1
Опухоль	18	10	5	0	0
Истощенные злокачественные клетки	1	5	0	4	1
Multi-Omyx	13	13	4	3	0
NanoString	18	9	6	0	0

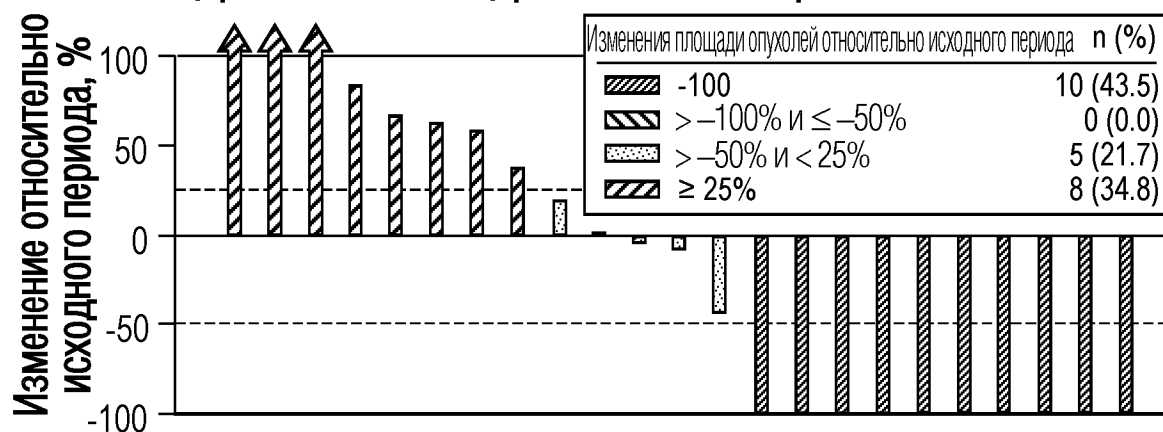
ФИГ. 6В

Инъекцированные очаги поражения



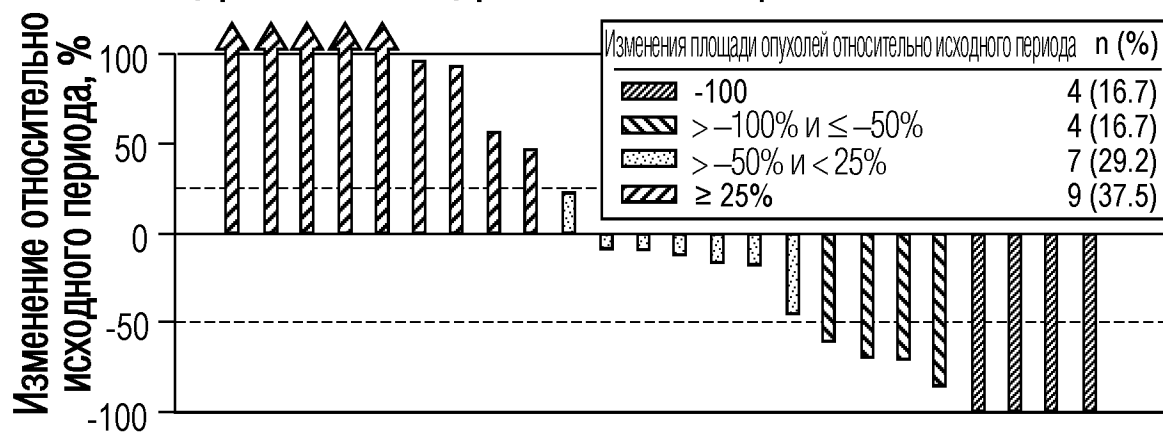
ФИГ. 7А

Неинъекцированные невисцеральные очаги поражения

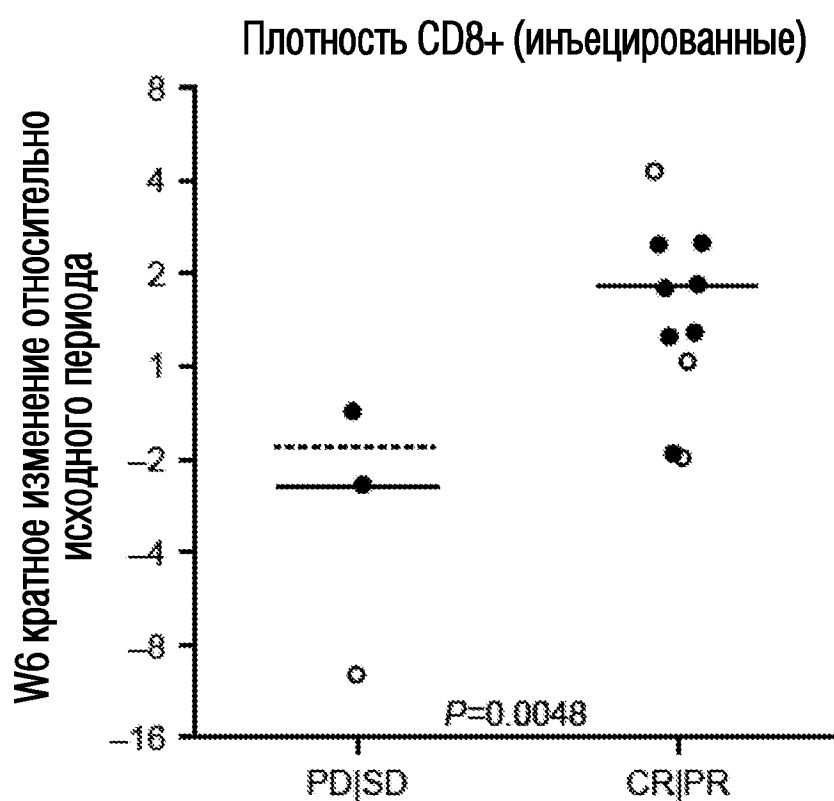


ФИГ. 7В

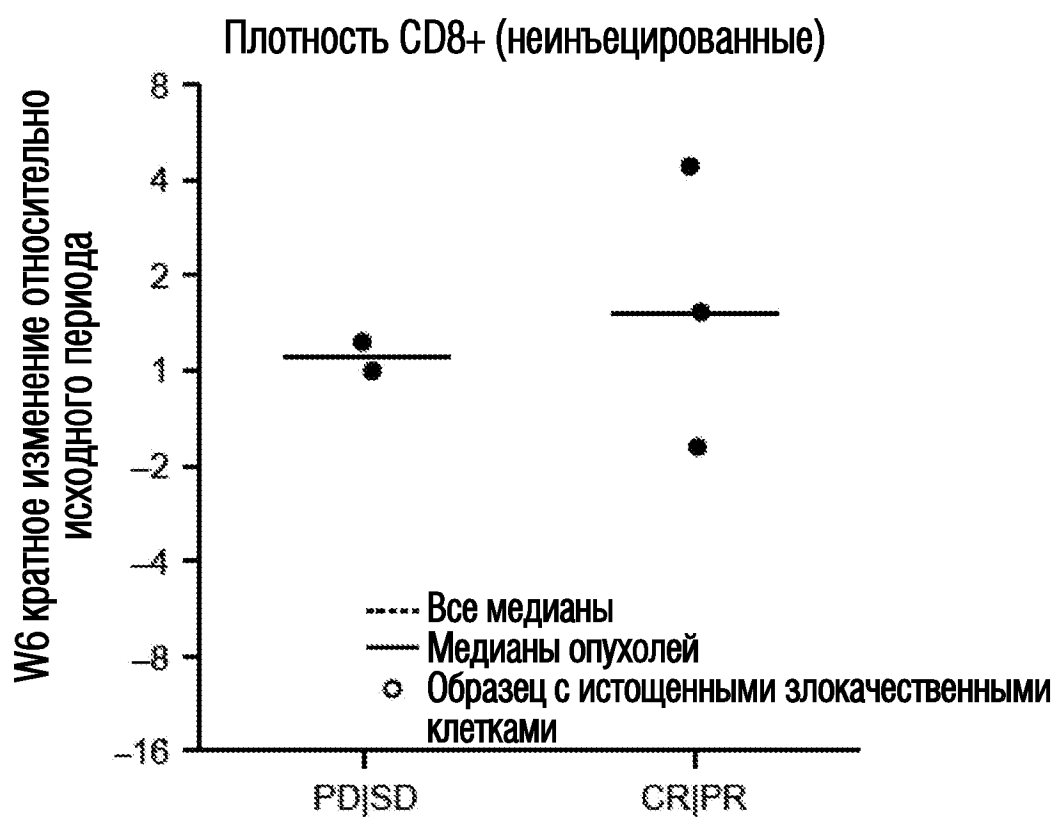
Неинъекцированные висцеральные очаги поражения



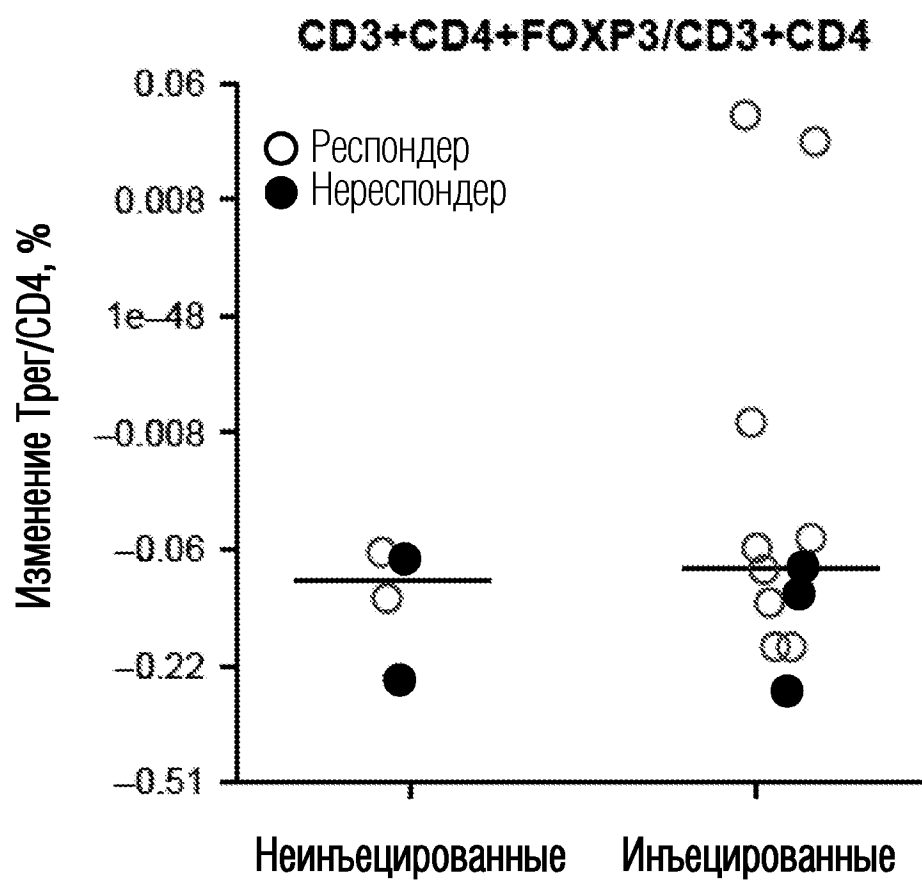
ФИГ. 7С



ФИГ. 8А

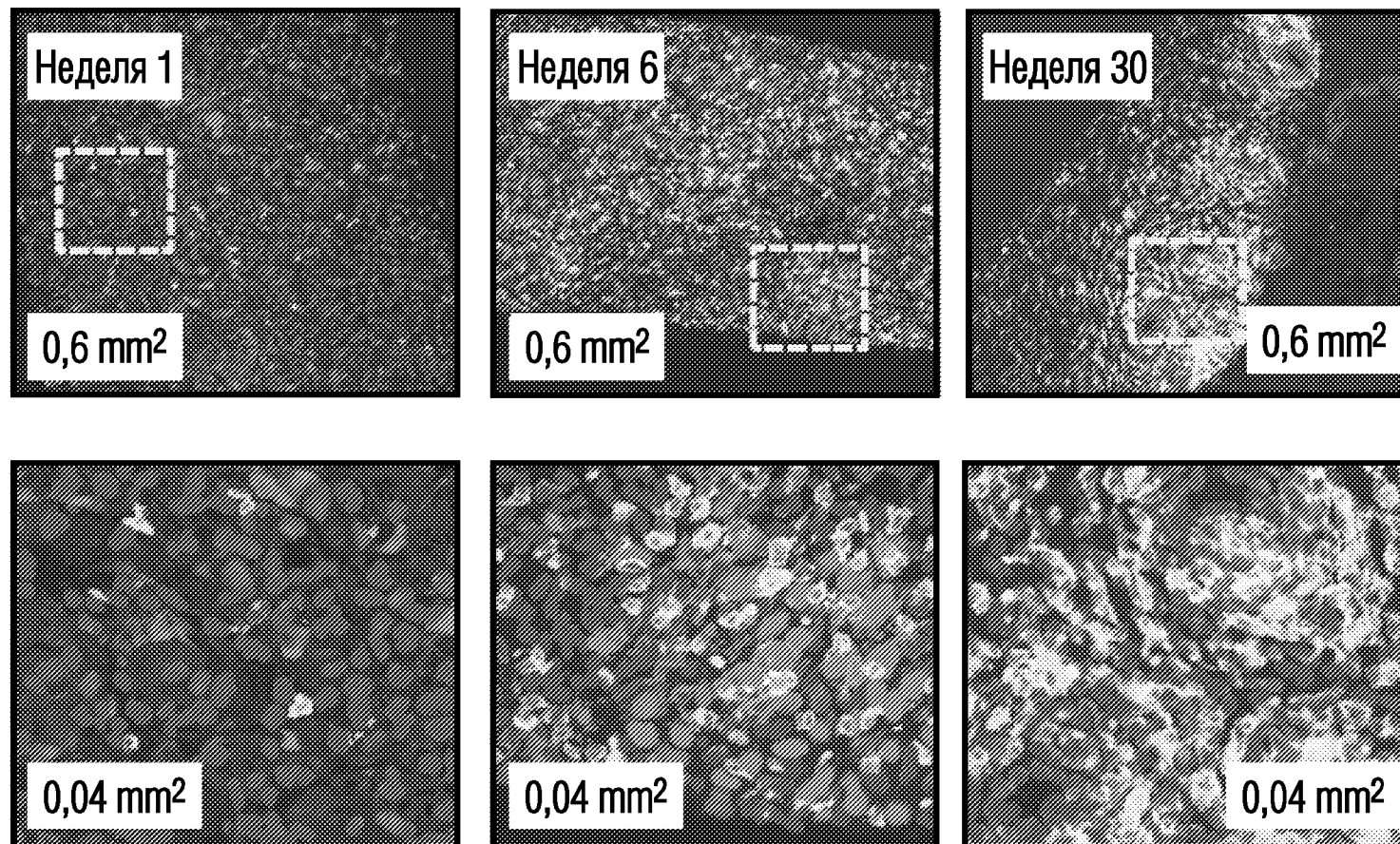


ФИГ. 8В



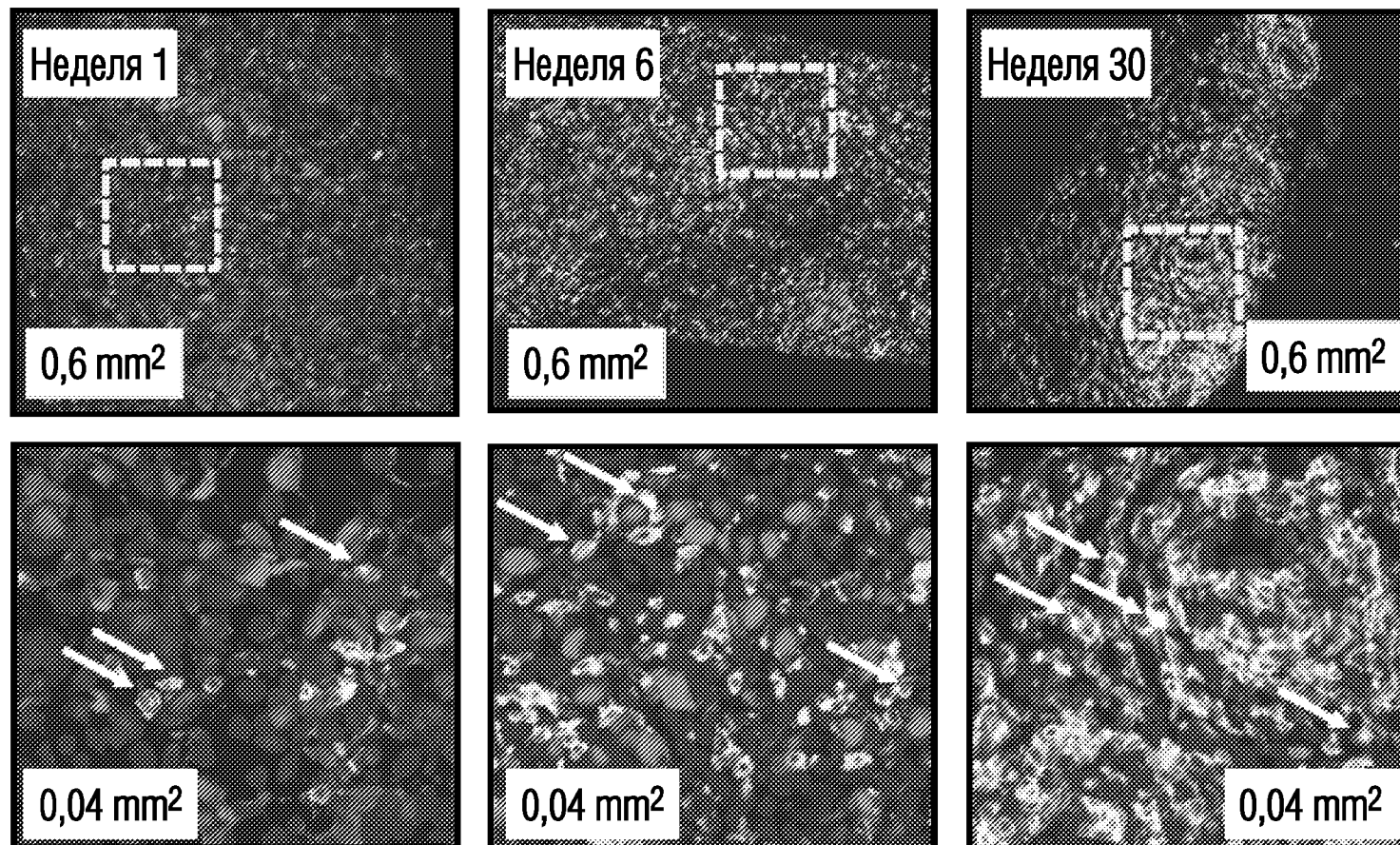
ФИГ. 9

PD-L1 CD8 S100



ФИГ. 10А

CD4 CD3 S100 FoxP3



ФИГ. 10В

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
ABCF1	NM_001090.2	IL2	NM_000586.2
ALAS1	NM_000688.4	IL4	NM_000589.2
AXL	NM_021913.2	ITGAL (CD11a)	NM_002209.2
Adipoq	NM_004797.2	ITGAM (CD11b)	NM_000632.3
Areg	NM_001657.2	Icam1	NM_000201.1
Arg1	NM_000045.2	Icos	NM_012092.2
Arg2	NM_001172.3	IcosL (B7-H2)	NM_015259.4
Atp6v0d2	NM_152565.1	Id2	NM_002166.4
Atp8b4	NM_024837.2	Ido1 (Indo)	NM_002164.3
B7-H3 (CD276)	NM_001024736.1	Ifi16	NM_005531.1
B7-H4 (VTCN1)	NM_024626.2	Ifitm1	NM_003641.3
BAGE	NM_001187.1	Ifngr2	NM_005534.3
BCL6	NM_138931.1	Igf1	NM_000618.3
BLNK	NM_013314.2	Igj	NM_144646.3
Batf	NM_006399.3	Ikzf3	NM_012481.3
Bcl11a	NM_022893.3	Ing1	NM_198219.1
Bcl11b	NM_022898.1	Ing2	NM_001564.2
Bst1	NM_004334.2	Insr	NM_000208.1
Bt1a	NM_181780.2	Irf1	NM_002198.1
CADM1	NM_014333.3	Irf2	NM_002199.2
CD112	NM_002856.2	Irf4	NM_002460.1
CD113	NM_015480.2	Irf6	NM_006147.2
CD127 (IL-7RA)	NM_002185.2	Irf7	NM_001572.3
CD14	NM_000591.2	Irf8	NM_002163.2
CD155	NM_006505.3	Itga1 (CD49)	NM_181501.1
CD160	NM_007053.2	Itga2 (CD49b)	NM_002203.2

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
CD163	NM_004244.4	Itgae (CD103)	NM_002208.4
CD167 DDR1	NM_001954.4	Itgax	NM_000887.3
CD2	NM_001767.2	Itk	NM_005546.3
CD200	NM_005944.5	Itm2a	NM_004867.4
CD200R1	NM_138939.2	Jak3	NM_000215.2
CD207-CLEC4K LangERIN	NM_015717.2	Jakmip1	NM_001099433.1
CD209	NM_021155.2	KIR2DL1	NM_014218.2
CD22 (Siglec-2)	NM_001771.2	KLK6	NM_002774.3
CD226	NM_006566.2	KLRG2 (CLEC15b)	NM_198508.2
CD244	NM_016382.2	Klrc1 (NKG2A)	NM_002259.3
CD24A	NM_013230.2	Klrc2 (NKG2c)	NM_002260.3
CD28	NM_001243078.1	Klrd1 (CD94)	NM_002262.3
CD3 дельта	NM_000732.4	Klrk1-NKG2D	NM_007360.1
CD3 эпсилон	NM_000733.2	LAIR1	NM_002287.3
CD3 zeta (CD247)	NM_198053.1	LIFR	NM_002310.3
CD300a	NM_007261.2	LILRA1 (CD85I)	NM_006863.1
CD300b (CD300LB) IREM3)	NM_174892.2	LILRA2 v1-2 (CD85H)	NM_001130917.1
CD300e (IREM2)	NM_181449.1	LILRA4 (CD85G)	NM_012276.3
CD300f (IREM1)	NM_139018.3	LILRA5 v3-4 (CD85F)	NM_181879.1
CD317 (Bst2)	NM_004335.2	Lag3 (CD223)	NM_002286.5
CD33	NM_001177608.1	Lamp2	NM_002294.2
CD4	NM_000616.3	Lat	NM_001014987.1
CD40 (TNFRSF5)	NM_001250.4	Lat2-линкер для активации Т-клеток член семейства 2	NM_014146.3

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
CD44	NM_001001392.1	Lck	NM_005356.2
CD45 (PTPRC)	NM_080921.2	Lgals3	NM_001177388.1
CD47	NM_001777.3	Lgals3BP	NM_005567.3
CD48	NM_001778.2	Lgals9-lectin	NM_002308.3
CD5	NM_014207.2	Li1RB4	NM_001081438.1
CD55	NM_000574.3	Lst1	NM_001166538.1
CD62L L-selectiN Sell	NR_029467.1	Ltk	NM_002344.5
CD68 (SCARD1)	NM_001251.2	Ly6e	NM_002346.2
CD69	NM_001781.1	Ly6g6c	NM_025261.2
CD7	NM_006137.6	Ly6g6d	NM_021246.2
CD72	NM_001782.2	MAGEA1–меланомы антиген семейства A	NM_004988.4
CD79A	NM_001783.3	MBL2	NM_000242.2
CD80	NM_005191.3	MER (MERTK)	NM_006343.2
CD84	NM_001184879.1	MLANA (Mart1)	NM_005511.1
CD86	NM_175862.3	MON1B	NM_014940.2
CD8b	NM_172099.2	MSA41 (CD20)	NM_152866.2
CD90 (Thy1)	NM_006288.2	Maf	NM_001031804.2
CD96	NM_005816.4	Mafb	NM_005461.3
CDH1 (E–кадгерин)	NM_004360.2	Marco (Scara2)	NM_006770.3
CLEC12A	NM_138337.5	Mica	NM_000247.1
CLEC15a (KLRG1 MAFA)	NM_005810.3	Micb	NM_005931.3
CLEC4A	NM_194448.2	Mn1	NM_002430.2
CLEC6A	NM_001007033.1	Mrc1	NM_002438.2

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
CSPG4	NM_001897.4	Myh4	NM_017533.2
CXCL11-ITAC	NM_005409.3	NCR2-NKp44	NM_004828.3
CXCL2 (GRO-beta MIP-2)	NM_002089.3	nFATC1	NM_172389.1
CXCL9-Mig	NM_002416.1	Nkg7	NM_005601.3
CXCR2	NM_001557.2	Nlrp10 (NOD)	NM_176821.3
Caspase 3	NM_032991.2	Nr4a2	NM_006186.3
Ccl19	NM_006274.2	Ny-eso-1 (CTAG1B)	NM_001327.2
Cel21	NM_002989.2	OAZ1	NM_004152.2
Cel24	NM_002991.2	OSCAR	NM_130771.3
Ccl27	NM_006664.2	PARK7	NM_001123377.1
Ccl13	NM_002983.2	PD-1 (Pdc1)	NM_005018.1
Ccl14	NM_002984.2	PDCD4	NM_014456.3
Ccl15	NM_002985.2	POLR1B	NM_019014.3
Ccl18	NM_005623.2	POLR2A	NM_000937.2
Ccr2	NM_001123041.2	PPARG	NM_015869.3
Ccr3	NM_001837.2	PPIA	NM_021130.2
Ccr4	NM_005508.4	Pdcd1Lg1 (PD-L1)	NM_014143.2
Ccr5	NM_000579.1	Pdcd1Lg2 (PD-L2)	NM_025239.2
Ccr6	NM_031409.2	Pdgfra	NM_006206.3
Ccr7	NM_001838.2	Phactr2	NM_001100164.1
Cdo1	NM_001891.2	Pi3kCA	NM_006218.2
Chi3l1	NM_001276.2	Pi3kCB	NM_006219.1
Chi3l2	NM_004000.2	Pi3kCD	NM_005026.3
Ciita	NM_000246.3	Pi3ICG	NM_002649.2
Clca1	NM_001285.3	Pilra (FDF03 ингибированный)	NM_178273.1

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
Clca2	NM_006536.5	Pilrb (FDF03 активированный)	NM_178238.1
Clec10a (также мышинный MGL1)	NM_182906.2	Postn	NM_001135935.1
Clec1b (Clec-2)	NM_016509.3	Ppplr2	NM_006241.4
Clec2d (OCIL)	NM_001004419.3	Prf1	NM_005041.3
Clec3b	NM_003278.2	Psmb10	NM_002801.2
Clec4d (MCL)	NM_080387.4	Psmb8	NM_004159.4
Clec4e (Mincle)	NM_014358.2	Psmb9	NM_002800.4
Clec4a (MDL-1)	NM_013252.2	Psme1	NM_006263.2
Clec7a (дектин-1)	NM_197954.2	Psme2	NM_002818.2
Clec9a	NM_207345.2	Pstpip1	NM_003978.3
Cmkrlr1	NM_004072.1	Pstpip2	NM_024430.3
Cpd	NM_001304.4	Pten	NM_000314.3
Crtam	NM_019604.2	Ptger2	NM_000956.2
Csflr	NM_005211.2	Ptger4	NM_000958.2
Csf2rb	NM_000385.2	Ptpn10 (Dusp1)	NM_004417.2
Cst6	NM_001323.3	Ptpn13	NM_080684.2
Cst7	NM_003650.3	Ptpn22	NM_015967.3
Ctla4	NM_005214.3	Ptpn3	NM_002831.5
Ctsb	NM_000100.2	Ptpn6	NM_002831.5
Ctsg	NM_001911.2	Ptpn7	NM_002832.3
Ctsz	NM_001336.3	Ptpncap	NM_005608.2
Cx3cl1	NM_002996.3	Ptpnf	NM_002840.3
Cx3cr1	NM_001337.3	Pvrig	NM_024070.3
Cxcl1 (GRO-alpha)	NM_001511.1	RGS16	NM_002928.2

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
Cxcl10 (IP-10)	NM_001565.1	RIKEN cDNA 4632428N05 (VISTA)	NM_022153.1
Cxcl13 (BCA-1)	NM_006419.2	RPL19	NM_000981.3
Cxcl14	NM_004887.4	Rarres2	NM_002889.3
Cxcl3	NM_002090.2	Rctnlb (Rclmb Fizz2)	NM_032579.2
Cxvl4 (Pf4)	NM_002619.2	Rgn	NM_152869.2
Cxcr3	NM_001504.1	Rora	NM_134261.2
Cxcr6	NM_006564.1	Rorc (ROR γ и T)	NM_001001523.1
Cxcr6	NM_020311.1	Runx1	NM_001754.4
DCK	NM_000788.2	Runx3	NM_004350.1
DCT	NM_001922.3	S100a8	NM_002964.3
Dab1	NM_021080.3	S100a9	NM_002965.2
Dap10 (HCST)	NM_001007469.1	SAMD3	NM_0010177373.2
Dap12 (TYROBP)	NM_003332.2	SART3	NM_014706.3
Def6	NM_022047.3	SDHA	NM_004168.1
Defb1	NM_005218.3	SIGLEC14	NM_001098612.1
Defb2	NM_004942.2	SIGLEC15 (CD33L3)	NM_213602.2
Dgkz	NM_001105540.1	SIGLEC5 (CD170; CD33L2)	NM_003830.2
Dpp4 (CD26)	NM_001935.3	Samhd1	NM_015474.2
Dsc1	NM_024421.2	Sema4a	NM_001193300.1
Dsc2	NM_024422.3	Serpinf1	NM_002615.4
Dsg2	NM_001943.3	Sgpp2	NM_152386.2
EEF1G	NM_001404.4	Sh2d1b	NM_053282.4
EGF	NM_001963.3	Sh2d2a	NM_001161443.1

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентифика- ционный номер гена	Номер для доступа транскрипта— мишени	Идентифика- ционный номер гена	Номер для доступа транскрипта— мишени
Efcmp1	NM_004105.3	Sirpb1	NM_006065.3
Egfr	NM_211282.1	Sirpg	NM_001039508.1
Egr2	NM_000399.3	Sit1	NM_014450.2
Eomes	NM_005442.2	Sla1	NM_001045556.2
Epcam	NM_002354.1	Sla2	NM_032214.2
Ezr	NM_003378.4	Slamf1 (CD150 Slam)	NM_003037.2
F2R (PAR-1)	NM_001992.2	Slamf6 (ntba)	NM_001184714.1
F2RL1 (PAR-2)	NM_005242.3	Slamf7 (Cracc)	NM_021181.3
FCER1A	NM_002001.2	Socs3	NM_003955.3
FCGR2A (CD32)	NM_021642.2	Stat1	NM_007315.2
FN1	NM_212482.1	Stat6	NM_003153.3
Fap	NM_004460.2	TBP	NM_001172085.1
FasI (TNFSF6)	NM_000639.1	TIMP3	NM_000362.4
Fcgr2b (CD32b)	NM_001002273.1	TIMP4	NM_003256.2
Fcrl3	NM_052939.3	TNFRSF10b- TRAIL R2 DR5	NM_003842.3
Folr4	NM_001199206.1	TNFRSF13B-TAC1	NM_012452.2
Foxp3	NM_014009.3	TNFRSF8-CD30	NM_152942.2
G6PD	NM_000402.2	TNFSF10-TRAIL CD253	NM_003810.2
GAPDH	NM_000181.1	TNFSF13B-BLYS	NM_006573.4
GUSB	NM_000181.1	TNFSF8-CD30L	NM_001244.2
Gas6	NM_000820.2	TREM1	NM_018643.3
Gata3	NM_001002295.1	TREM2	NM_018965.2
Gdf10	NM_004962.2	TREML1 (TLT-1)	NM_178174.2

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени	Идентификационный номер гена	Номер для доступа транскрипта-мишени
Gfi1	NM_005263.2	TREML2 (TLT-2)	NM_024807.2
Gitr (Tnfrsf18)	NM_004195.2	TUBB	NM_178014.2
Gitrl (Tnfsf18)	NM_005092.2	TYR (тирозиназа)	NM_000372.4
Gnly	NM_006433.2	TYRO3	NM_006293.2
Gpld1	NM_001503.2	Tagap	NM_054114.3
gpr18	NM_001098200.1	TCR гамма-альтернативная рамка считывания белка	NM_001003799.1
Grap2	NM_004810.2	Tbx21 (Tbet)	NM_013351.1
Gzma	NM_006144.2	Tcn2	NM_000355.2
Gzmb	NM_004131.3	Tigit	NM_173799.2
Gzmk	NM_002104.2	Tmem2	NM_013390.2
HLA-A (HLA Class I)	NM_002116.5	Tnfa	NM_000594.2
HLA-B	NM_005514.6	Tnfaip3	NM_006290.2
HLA-C	NM_002117.4	Tnfaip6	NM_007115.2
HLA-DRA (HLA class II)	NM_019111.3	Tnfaip8L2	NM_024575.3
HLA-E	NM_005516.4	Tnfrsf14 (Hvem)	NM_003820.2
HPRT1	NM_000194.1	Tnfrsf4 (Ox40)	NM_003327.2
Havcr1-Tim1	NM_001099414.1	Tnfrsf7 (Cd27)	NM_001242.4
Havcr2-Tim3	NM_032782.3	Tnfrsf9 (CD137 4-1BB)	NM_001561.4
Hcls1	NM_005335.4	Tnfsf14 (LIGHT)	NM_003807.2
Hgfac	NM_001528.2	Tnfsf4	NM_003326.2
Hif1a	NM_001530.2	Tnfsf7 CD27L	NM_001252.2

ФИГ. 11
(продолжение)

Идентифика- ционный номер гена	Номер для доступа транскрипта– мишени	Идентифика- ционный номер гена	Номер для доступа транскрипта– мишени
Hpx	NM_001145460.1	Tnfrsf9 (4-1BBL)	NM_003811.3
IFNg	NM_000619.2	Tox	NM_014729.2
IGSF6	NM_005849.2	Trat1	NM_016388.2
IL-10R1	NM_001558.2	UBB	NM_018955.2
IL-2RA	NM_000417.1	Ubash3a	NM_001001895.1
IL-2RB	NM_000878.2	Ubash3b	NM_032873.3
IL-2Rg	NM_000206.1	VCAM	NM_001078.3
IL-37	NM_014439.3	Xist	NM_001564.1
IL-10	NM_000572.2	Zap70	NM_001079.3
IL-18	NM_001562.2	Zbtb16	NM_006006.4
IL18R1	NM_003855.2	Zbtb32	NM_014383.1

ФИГ. 11
(продолжение)

