

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992835 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.15

(22) Дата подачи заявки
2018.06.01

(51) Int. Cl. C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) ПРОТИВОРАКОВАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

(31) 17174323.0; 17196949.6

(32) 2017.06.02; 2017.10.17

(33) EP

(86) PCT/EP2018/064445

(87) WO 2018/220169 2018.12.06

(71) Заявитель:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Хильберг Франк, Хофманн Марко
Ханс, Решке Маркус, Солька Флавио
(DE)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к комбинированному применению определенных биспецифических, VEGF и Ang2 связывающих молекул с PD1 антагонистами для лечения злокачественного новообразования. Оно также относится к фармацевтическим композициям и наборам, включающим такие связывающие молекулы и антагонисты.

A1

201992835

201992835

A1

ПРОТИВОРАКОВАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

5 **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения злокачественного новообразования и к соединениям для применения в такой комбинированной терапии. Соединения для комбинации представляют собой биспецифическую связывающую молекулу, такую как производное антитела, и
10 PD-1 антагонист.

Предпосылки создания изобретения

Ангиогенез представляет собой развитие новых кровеносных сосудов для обеспечения питательного кровоснабжения и является необходимым условием
15 для роста и выживания солидных опухолей. Были предприняты подходы для лечения злокачественных новообразований, в которых нацеливаются на ключевые молекулы, вовлеченные в ангиогенные пути. Они включают способы ингибирования путей передачи сигналов посредством фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), поскольку VEGF рассматривается как наиболее эффективный
20 ангиогенный фактор роста.

Рак легких является основной причиной смертности вследствие злокачественных новообразований с около 1,6 миллионов смертельных исходов во всем мире в 2012 г. или около 20% смертности от злокачественных новообразований в целом (Molina и др., Mayo Clin Proc. 2008;83(5):584-594; Chan и др., Transl Lung Cancer
25 Res. 2014;4(1):36-54). Наиболее распространенным типом рака легких является немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), который отвечает приблизительно за 85% всего рака легких (Chen и др. Nat Rev Cancer 2014;14:535-546; Nawaz и др. Nat Rev Drug Discov. 2016;15:229-230). В настоящее время NSCLC
30 рассматривается как включающий гетерогенный набор заболеваний, имеющих различные патофизиологические характеристики, в частности, наиболее известными подтипами являются аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома (SCC) и крупноклеточный рак.

В последние годы, для лечения злокачественных новообразований, в особенности для NSCLC, были разработаны различные новые терапевтические

подходы для пациентов с местно распространенным или метастатическим
 заболеванием во время диагностики, дополнительно к химиотерапии и лучевой
 терапии. Эти новые методы лечения представляют собой нацеленные терапии,
 действующие, например, низкомолекулярные ингибиторы или рецепторные
 5 моноклональные антитела (mAb) и основаны на изменениях основных
 метаболических путей передачи сигналов в клетках и регуляторных путей –
 включая изменения в рецепторных тирозинкиназах (ТК), таких как рецептор
 эпидермального фактора роста (EGFR), и изменения в ангиогенных путях –
 которые часто встречаются при раке легких. Большая часть последних работ
 10 была сфокусирована на мутациях EGFR и на аномальном слиянии киназы
 анапластической лимфомы (ALK), которые ингибируются EGFR ингибиторами
 тирозинкиназы и кризотинибом. Также было показано, что комбинирование
 введения моноклонального антитела бевацизумаба, которое нацелено на VEGF, с
 химиотерапией приводит к существенному улучшению для пациентов с
 15 колоректальным раком (Hurwitz и др. *New Eng J Med* 2004;350:2335-2342) или
 распространенным неплоскоклеточным NSCLC (Sandler и др. *J Clin Oncol*
 2005 23(16s pt 1):2s). Дополнительно к терапиям блокирования компонентов,
 непосредственно вовлеченных в путь VEGF, например, Ангиопэтина 2 (Ang2),
 другой перспективной мишенью для лечения злокачественного новообразования
 20 является лиганд Tie2 рецепторной тирозинкиназы, контролирующей
 ремоделирование сосудов путем обеспечения возможности функционирования
 других ангиогенных факторов, таких как VEGF.
 WO2010/040508 и Kienast и др. (*Clin Cancer Res*; 19(24), 2013) описали
 вануцизумаб, биспецифическое анти-VEGF/анти-Ang-2 антитело и его
 25 применение для лечения злокачественного новообразования.
 EP2694546 B1 и WO2012/131078 A1 относится к биспецифической связывающей
 молекуле, включающей одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,
 связывающий VEGF, и одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,
 связывающий Ang2, и дополнительно одиночный вариабельный домен
 30 иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, которая используется
 для лечения злокачественного новообразования и других заболеваний.
 WO2016/170039 A1 относится к комбинированной терапии с применением
 антитела, которое специфически связывается с Ангиопэтином-2, с антителом,

которое специфические связывается с полипептидом 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1).

WO2016/170040 A1 относится к комбинированной терапии с применением антитела, которое специфические связывается с Ангиопоэтином-2 и антитела, которое специфические связывается с VEGF, с антителом, которое специфические связывается с лигандом белка запрограммированной смерти 1 (PD-L1).

Несмотря на все эти подходы, все еще существует потребность в улучшенных терапевтических подходах для пациентов со злокачественными новообразованиями. Следовательно, задачей настоящего изобретения является обеспечение фармацевтических композиций и способов лечения злокачественных новообразований для улучшения терапевтической эффективности и применимости.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациента с применением биспецифического анти-VEGF/анти-Ang-2 антитела совместно с антагонистом к белку запрограммированной смерти 1 (PD-1) – иммуноингибирующему белку, который отрицательно регулирует сигналы рецепторов Т-клеток. Лечение приводит к существенному уменьшению роста опухоли или даже к уменьшению размеров опухоли (Фигура 1). Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает комбинированную терапию, включающую биспецифическое анти-VEGF/анти-Ang-2 антитело и PD-1 антагонист.

В более подробном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения и/или предотвращения онкологического или гиперпролиферативного заболевания, в особенности злокачественного новообразования или опухолевого заболевания, включающему введение пациенту, который в этом нуждается

- а) терапевтически эффективного количества Соединения А, и
- б) терапевтически эффективного количества Соединения В,

где

- Соединение А представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, включающую
 - одиночный переменный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF,

- одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, и
- одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2,

5 где

- указанный VEGF связывающий одиночный вариабельный домен иммуноглобулина имеет следующие CDR последовательности:
 - CDR1: SYSMG (SEQ ID NO: 1)
 - CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG (SEQ ID NO: 2)
 - CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY (SEQ ID NO: 3)
- указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, имеет следующие CDR последовательности:
 - CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 4)
 - CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
 - CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 6),
- указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2, имеет следующие CDR последовательности:
 - CDR1: DY AIG (SEQ ID NO: 7)
 - CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8)
 - CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA (SEQ ID NO: 9) и

где

- Соединение В представляет собой PD-1 антагонист.

В связанном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает Соединение А и Соединение В, каждое для применения в способе лечения и/или предотвращения онкологического или гиперпролиферативного заболевания, где указанный способ включает введение Соединения А и Соединения В пациенту, который в этом нуждается.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению Соединения А и Соединения В, каждого для приготовления фармацевтической композиции для лечения и/или предотвращения онкологического или гиперпролиферативного

заболевания, где Соединение А и Соединение В, предназначены для или обеспечиваются для комбинированного введения Соединения А и Соединения В. В другом аспекте, настоящее изобретение описывает фармацевтическую композицию, включающую

- 5 а) Соединение А и
 б) Соединение В

где

- Соединение А представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, включающую

- 10 ○ одиночный переменный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF,
- одиночный переменный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, и
- 15 ○ одиночный переменный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2,

где

- указанный VEGF связывающий одиночный переменный домен иммуноглобулина имеет следующие CDR последовательности:
- 20 ▪ CDR1: SYSMG (SEQ ID NO: 1)
- CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG (SEQ ID NO: 2)
- CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY (SEQ ID NO: 3)
- указанный одиночный переменный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин,
- 25 имеет следующие CDR последовательности:
- CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 4)
- CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
- CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 6),
- 30 ○ указанный одиночный переменный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2, имеет следующие CDR последовательности:
- CDR1: DY AIG (SEQ ID NO: 7)
- CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8)

▪ CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYDYDA (SEQ ID NO: 9)

и

где

- Соединение В представляет собой PD-1 антагонист.

В дальнейшем аспекте, настоящее изобретение относится к набору, содержащему

а) первую фармацевтическую композицию, включающую Соединение А, и

б) вторую фармацевтическую композицию, включающую Соединение В,

где Соединение А и Соединение В имеют значения, как определено выше.

10

Описание фигур

На **Фигуре 1** представлено ингибирование роста опухоли при лечении 9 тестируемых индивидуумов (открытые треугольники, нижние линии) с применением биспецифической связывающей молекулы VEGFANGBII22 (соединение А) (доза: 15 мг/кг; схема: каждые 3-4 дня) (А-В) и CrossMab анти-VEGF/анти-Ang-2 антитела (вануцизумаб) (доза: 15 мг/кг; схема: каждые 3-4 дня), как определено в WO2010/040508 или Kienast и др. (2013, *выше*) (С-Д), соответственно, в комбинации с крысиным IgG2a анти-мышиним PD-1 антителом EX 101359 (клон RMP1-14) (доза: 10 мг/кг; схема: каждые 3-4 дня), по сравнению с 9 нелечеными индивидуумами (закрашенные круги, верхние линии). Леченым индивидуумам дополнительно вводили низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы ваталаниб (EXBF003) (доза: 100 мг/кг; схема: один раз сутки), с имитирующей анти-VEGF активностью на моделях у мышей. Лечение начинали в день 5 после инъекции 5×10^4 LL/2 подкожных опухолевых клеток на индивидуальную мышь. Представлены объем опухоли в мм³ (А, С) и соответствующий рандомизированный, относительный объем опухоли (В, D), соответственно, до дня 35 эксперимента.

На **Фигуре 2** представлена средняя выживаемость мышей, леченных с применением контрольного / изотипического антитела, анти-PD1 антитела (доза: 10 мг/кг; схема: каждые 3-4 дня), VEGFANGBII22 (доза: 15 мг/кг; схема: каждые 3-4 дня), ваталаниб (доза: 100 мг/кг; схема: один раз сутки), ваталаниб плюс анти-PD1 антитело, ваталаниб плюс анти-PD1 антитело плюс VEGFANGBII22, или анти-PD1 антитело плюс VEGFANGBII22. Каждая леченная группа состояла из 10 индивидуальных несущих опухолей рандомизированных мышей. Лечение

начинали в день 3 после инъекции 5×10^4 LL/2 подкожных опухолевых клеток на индивидуальную мышь.

Подробное описание изобретение

Настоящее изобретение относится к способу, соединениям для применения, применению соединений, фармацевтическим композициям и наборам, все они относятся к комбинированной терапии или комбинированному использованию Соединения А и Соединения В, где

- Соединение А представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, включающую

- одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF,
- одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, и
- одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2

где

- указанный VEGF связывающий одиночный вариабельный домен иммуноглобулина имеет следующие CDR последовательности:

- CDR1: SYSMG (SEQ ID NO: 1)
- CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG (SEQ ID NO: 2)
- CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY (SEQ ID NO: 3)

- указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, имеет следующие CDR последовательности:

- CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 4)
- CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
- CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 6),

- указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2, имеет следующие CDR последовательности:

- CDR1: DYAIG (SEQ ID NO: 7)
- CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8)
- CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA (SEQ ID NO: 9) и

где

- Соединение В представляет собой PD-1 антагонист.

Изобретатели настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация Соединения А и Соединения В приводит к существенному уменьшению, или даже сокращению, роста опухоли по сравнению с терапией с применением только Соединения А или только Соединения В. Соединение А и В работают совместно синергетически и могут приводить к уменьшению злокачественного новообразования.

Соединение А в соответствии с настоящим изобретением представляет собой биспецифическую анти-VEGF/анти-Ang-2 связывающую молекулу. Анти-ангиогенные терапии становятся важной терапевтической возможностью лечения для нескольких типов опухолей. Эти терапии сфокусированы на блокировании VEGF пути (Ferrara и др., *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400) путем нейтрализации VEGF или его рецепторов. Недавние исследования у мышей показали, что Ангиопоэтин2 (Ang2), лиганд Tie2 рецептора, контролирует ремоделирование сосудов путем предоставления возможности функционирования других ангиогенных факторов, таких как VEGF. Ang2 экспрессируется главным образом эндотелиальными клетками, сильно индуцируется гипоксией и другими ангиогенными факторами, и было показано, что они регулируют пластичность опухолевых сосудов, предоставляя возможность сосудам отвечать на VEGF и FGF2 (Augustin и др., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165-77). В соответствии с этой ролью, делеция или ингибирование Ang2 приводит к уменьшенному ангиогенезу (Gale и др., *Dev Cell.* 2002;3(3):302-4) (Falcon и др., *Am J Pathol.* 2009;175(5):2159-70). Повышенные концентрации Ang2 в сыворотке были описаны для пациентов с колоректальным раком, NSCLC и меланомой (Goede и др., *Br J Cancer.* 2010 Oct 26;103(9):1407-14), (Park и др., *Chest.* 2007;132(1): 200-6), (Helfrich и др., *Clin Cancer Res.* 2009 15;15(4):1384-92). При CRC раке уровни Ang2 в сыворотке коррелируют с терапевтическим ответом на анти-VEGF лечение.

Ang2 представляет собой секретируемый лиганд с молекулярным весом 66 кДа для Tie2 рецепторной тирозинкиназы (Augustin и др., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165-77). Ang2 состоит из N-концевого суперспирального домена и C-концевого фибриноген-подобного домена, последний необходим для Tie2 взаимодействия. Ang2 экспрессируется главным образом эндотелиальными клетками и сильно индуцируется гипоксией и другими ангиогенными факторами, включая VEGF. Tie2 был обнаружен в эндотелиальных клетках,

гематопозитических стволовых клетках и опухолевых клетках. Было показано, что Ang2-Tie2 регулирует пластичность опухолевых сосудов, предоставляя возможность сосудам отвечать на VEGF и FGF2.

Система Ang-Tie состоит из 2 рецепторов (Tie1 и Tie2) и 3 лигандов (Ang1, Ang2 и Ang4) (Augustin и др., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165-77). Tie2, Ang1 и Ang2 являются наиболее изученными представителями этого семейства, Tie1 представляет собой «сиротский» рецептор и роль Ang4 для ремоделирования сосудов необходимо изучать дополнительно. Ang2 и Ang1 опосредуют противоположные функции при связывании и активации Tie2. Ang2-опосредуемая активация Tie2 приводит к активации эндотелиальных клеток, диссоциации перицитов, сосудистой утечки и индукции разрастания сосудов. В отличие от Ang2, передача сигналов посредством Ang1 поддерживает целостность сосудов путем захвата перицитов, таким образом поддерживая латентность эндотелиальных клеток.

Биспецифические анти-VEGF/анти-Ang-2 связывающие молекулы, которые можно использовать в соответствии с изобретением, описаны, например, в WO2012/131078, которая включена в настоящую заявку путем ссылки).

Соединение В в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антагонист к представителю семейства белков запрограммированной смерти 1 (PD-1), таких как сам PD-1 или один из его лигандов, PD-L1 или PD-L2. PD-1 известен в качестве иммуноингибирующего белка, который отрицательно регулирует сигналы TCR (Ishida, Y. и др. (1992) *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. и др. (2006) *Immunol. Immunother.* 56(6):739-745). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 может функционировать в качестве контрольной точки иммунного ответа, что может приводить, например, к снижению инфильтрации опухоли лимфоцитами, снижению пролиферации, опосредованной Т-клеточными рецепторами, и/или к уклонению злокачественных клеток от иммунной системы (Dong и др. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank и др. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi и др. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Иммунная супрессия может быть реверсирована путем ингибирования местного взаимодействия PD-1 с PD-L1 или PD-L2; эффект является аддитивным, если также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai и др. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* 99:12293-7; Brown и др. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

PD-1 является ингибирующим представителем расширенного CD28/CTLA-4 семейства Т-клеточных регуляторов. Другие представители CD28 семейства включают CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. Предполагают, что PD-1 существует в качестве мономера, в котором отсутствует неспаренный цистеиновый остаток, характерный для других представителей семейства CD28. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и моноцитах (Okazaki и др. (2002) *Curr Opin Immunol* 14:391779-82; Bennett и др. (2003) *J. Immunol.* 170:711-8). Было идентифицировано два лиганда для PD-1, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), которые, как было показано, понижающе регулируют активацию Т-клеток при связывании с PD-1 (Freeman и др. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027-34; Carter и др. (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:634-43). Оба PD-L1 и PD-L2 представляют собой B7 гомологи, которые связываются с PD-1. PD-L1 широко распространен при различных злокачественных новообразованиях у людей (Dong и др. (2002) *Nat. Med.* 8:787-9).

Ген PD-1 кодирует трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 55 кДа, который является частью суперсемейства гена Ig (Agata и др. (1996) *Int Immunol.* 8:765-72). Полную последовательность PD-1 можно найти по номеру доступа GenBank U64863. Несмотря на структурное сходство с CTLA-4, в PD-1 отсутствует MYPPY мотив (SEQ ID NO: 10), который является важным для связывания B7-1 и B7-2.

С учетом изложенного выше, моноклональные антитела в качестве PD-1 антагонистов разрабатывались в последние годы для применения в терапии, более предпочтительно, для лечения различных заболеваний, включая злокачественные новообразования и инфекционные заболевания (например, WO2006/121168; WO2015/112900). Любое из таких антител можно использовать в соответствии с настоящим изобретением.

Изобретатели настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что лечение индивидуумов с применением комбинации Соединения А и Соединения В, как определено выше /ниже, приводит к существенно более сильному уменьшению - или даже «сморщиванию» - объема опухоли по сравнению с лечением с применением только Соединения А или только Соединения В. Кроме того, при сравнении с лечением индивидуумов с применением вануцизумаба и такого же самого PD-1 антагониста, лечение с применением композиции, включающей Соединение А и Соединение В, как определено выше /ниже, даже будет

приводить к уменьшению размеров опухоли (Пример 1; Фигура 1). Оба компонента - Соединение А и Соединение В являются активными веществами в соответствии с настоящим изобретением.

5 PD-1 антагонист в контексте настоящего изобретения представляет собой соединение, которое ингибирует взаимодействие PD-1 с его рецептором (ами) или лигандом (ами).

Предпочтительно, PD-1 антагонист представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1. PD-1 антагонист предпочтительно может представлять собой анти-PD-1-антитело или анти-PD-L1-антитело, и более предпочтительно
10 гуманизированное или полностью человеческое анти-PD-1 антитело или гуманизированное или полностью человеческое анти-PD-L1 антитело. Любое из этих антител может представлять собой рекомбинантное человеческое антитело.

Термин “антитело” используется в настоящей заявке в наиболее широком значении и охватывает различные структуры антител, включая, но не
15 ограничиваясь только ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, и фрагментированные антитела (также обозначается в настоящей заявке как фрагменты антител), такие как Fab, F(ab)₂, F(ab')₂, Fab', одноцепочечные
20 переменные фрагменты (scFv) или антигенсвязывающие домены антитела, при условии, что они проявляют желательную антигенсвязывающую активность.

Антитело может иметь эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC, которая обычно опосредуется Fc частью (константная область антитела) антитела, или оно может не иметь эффекторной функции, например, путем
25 отсутствия Fc части или имея заблокированную, замаскированную Fc часть, по сути, Fc часть, которая не распознается или недостаточно распознается иммунными клетками или компонентами иммунной системы, такими как система комплемента.

Антитело или его фрагмент могут быть любого типа, например, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Предпочтительным является IgG.
30

Термины “моноклональное антитело” или “композиция на основе моноклонального антитела”, как используется в настоящей заявке, относится к препарату молекул антител одного аминокислотного состава.

“Рекомбинантное антитело” представляет собой антитело, которое продуцируется рекомбинантно сконструированной клеткой-хозяином. Оно необязательно является выделенным или очищенным.

5 “Антитело человека” представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого клеткой человека или имеющего происхождение из источника, отличающегося от человека, который использует репертуар антител человека или других последовательностей, кодирующих антитело человека. Это определение антитела человека специфически исключает гуманизированное
10 антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

Термин “рекомбинантное антитело человека”, как используется в настоящей заявке, охватывает все антитела человека, которые приготовлены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных методов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как NS0 или CHO
15 клетка, или из животного (например, мыши), которая трансгенна для генов иммуноглобулина человека, или антитела, экспрессированные с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфектированного в клетку-хозяин. Такие рекомбинантные антитела человека имеют варианты и константные области в перекомпонованной форме. Рекомбинантные антитела
20 человека в соответствии с изобретением были подвержены соматической гипермутации в условиях *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности VH и VL участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, несмотря на то, что имеют происхождение из и родственны VH и VL последовательностям зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии
25 человека в условиях *in vivo*.

“Гуманизированное” антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из нечеловеческих гипервариабельных участков (HVR) и аминокислотные остатки из человеческих FR. В определенных вариантах осуществления, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из
30 по меньшей мере одного, и типично двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все из HVR (например, участки, определяющие комплементарность (CDR)) соответствуют таким участкам нечеловеческого антитела, и все или по существу полные каркасные участки (FR) соответствуют

таковым участкам антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, имеющей происхождение из антитела человека. “Гуманизированная форма” антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое

5 было подвергнуто гуманизации.

“Связывание полипептида (такого как иммуноглобулин, антитело, одиночный переменный домен иммуноглобулина в соответствии с изобретением, или в общем случае антиген-связывающей молекулы или ее фрагмента) обозначает

10 “имеющий аффинность к” или “имеющий специфичность к” определенному эпитопу, антигену или белку (или к по меньшей мере его одной части, фрагменту или эпитопу).

В целом, термин “специфичность” относится ко многим различным типам антигенов или эпитопов, с которыми может связываться антигенсвязывающая молекула или антигенсвязывающий белок (такой как одиночный переменный

15 домен иммуноглобулина в соответствии с изобретением). Специфичность антигенсвязывающей молекулы можно определить на основании ее аффинности и/или авидности. Аффинность, характеризуемая константой равновесия для диссоциации антигена с антигенсвязывающим белком (KD), представляет собой критерий прочности связывания между эпитопом и антигенсвязывающим сайтом

20 на антигенсвязывающем белке: чем меньше значение KD , тем сильнее прочность связывания между эпитопом и антигенсвязывающей молекулой (альтернативно, аффинность также может быть выражена в виде константы аффинности (KA), которая равна $1/KD$). Как является очевидным для квалифицированного специалиста в данной области техники (например, на основании дальнейшего

25 раскрытия, представленного в настоящей заявке), аффинность может быть определена с помощью способа, известного *per se*, в зависимости от специфического антигена, представляющего интерес. Авидность является показателем силы связывания между антигенсвязывающей молекулой (такой как иммуноглобулин, антитело, одиночный переменный домен иммуноглобулина

30 или полипептид), содержащим его, и релевантным антигеном. Авидность относится как к аффинности между эпитопом и его антигенсвязывающим сайтом на антигенсвязывающей молекуле и различными релевантными антигенсвязывающими сайтами, присутствующими на антигенсвязывающей молекуле.

Встречающиеся в природе антитела являются, например, моноспецифическими. Термин “моноспецифическое антитело”, как используется в настоящей заявке, обозначает антитело, которое имеет один или несколько связывающих сайтов, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена. “Мультиспецифические антитела” связываются с двумя или больше различными эпитопами (например, двумя, тремя, четырьмя или больше различными эпитопами). Эпитопы могут находиться на одном и том же или различных антигенах. Примером мультиспецифического антитела является “биспецифическое антитело”, которое связывается с двумя различными эпитопами. Если антитело обладает более чем одной специфичностью, то распознаваемые эпитопы могут быть связаны с единичным антигеном или более чем с одним антигеном.

Эпитоп представляет собой участок антигена, который связывается антителом или антигенсвязывающей частью. Термин “эпитоп” включает любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с антителом или антигенсвязывающей частью. В определенных вариантах осуществления, эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, гликановые боковые цепи, фосфорил или сульфонил, и, в определенных вариантах осуществления, могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, и/или специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с исходным, но не с последним, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Как используется в настоящей заявке, термины “связывание” и “специфическое связывание” относятся к связыванию антитела или антигенсвязывающей части с эпитопом антигена в анализе *in vitro*, предпочтительно в исследовании плазмонного резонанса (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) с очищенным антигеном дикого типа.

Аффинность связывания связывающих молекул (например, антител) в соответствии с настоящим изобретением, включая их антитела Соединения А или Соединения В, с антигеном определяется терминами k_a (константа скорости ассоциации для антитела от комплекса антитело/антиген), k_D (константа диссоциации), и K_D (k_D/k_a). В одном варианте осуществления, связывание или который (ая) специфически связывается, обозначает аффинность связывания

(K_D) 10^{-8} моль/л или меньше, в одном варианте осуществления 10^{-8} М - 10^{-13} моль/л. Таким образом, мультиспецифическое антитело в соответствии с изобретением специфически связывается с каждым антигеном, к которому оно специфично, с аффинностью связывания (K_D) 10^{-8} моль/л или меньше, например, с аффинностью связывания (K_D) 10^{-8} - 10^{-13} моль/л. В одном варианте осуществления, с аффинностью связывания (K_D), составляющей 10^{-9} - 10^{-13} моль/л.

Выражения “вариабельный домены” или “вариабельный участок” или Fv, как используется в настоящей заявке, обозначает каждую из пары легких и тяжелых цепей, которая непосредственно задействована в связывание антитела с антигеном. Вариабельный домен легкой цепи сокращенно обозначается как “VL” и вариабельный домен тяжелой цепи сокращенно обозначается как “VH”. Вариабельные домены легкой и тяжелой цепи имеют такую же общую структуру и каждый домен включает четыре каркасные (FR) участки, последовательности которых в значительной степени консервативны, соединенные с помощью трех HVR (или CDR). Каркасные участки принимают бета-складчатую конформацию и CDR могут образовывать петли, соединяющие бета-складчатую структуру. CDR в каждой цепи удерживаются в их трехмерной структуре с помощью каркасных участков и образуют совместно с CDR из другой цепи антигенсвязывающий сайт. CDR3 участки тяжелой и легкой цепи антитела играют чрезвычайно важную роль в связывающей специфичности/аффинности антител в соответствии с изобретением и, следовательно, составляют дальнейший объект в соответствии с изобретением.

Термин “константные домены” или “константная область”, как используется в настоящей заявке, обозначает совокупность доменов антитела, отличающихся от вариабельного участка. Константная область непосредственно не вовлечена в связывание антигена, но проявляет различные эффекторные функции.

“Константные домены”, как используется в антителах, раскрытых в настоящей заявке, предпочтительно имеют человеческое происхождение, которые состоят из константного участка тяжелой цепи антитела человека подкласса IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4 и/или константного участка каппа или лямбда легкой цепи. Такие константные домены и участки хорошо известны в данной области техники и описаны, например, Kabat и др. (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, № публикации 91).

“Fc часть” антитела не вовлечена непосредственно в связывание антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции. “Fc часть антитела” представляет собой термин, хорошо известный квалифицированному специалисту в данной области техники, и определяется на основании расщепления антител папаином. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей, антитела или иммуноглобулины подразделяются на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, IgA1, и IgA2. В соответствии с константными областями тяжелых цепей, различные классы иммуноглобулинов называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Fc часть антитела непосредственно вовлечена в ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность) на основании активации комплемента, C1q связывания и связывания Fc-рецептора. Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора комплемента C1q с Fc частью большинства подклассов антител IgG. Несмотря на то, что воздействие антител на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q вызывается определенными связывающими сайтами в Fc части. Такие связывающие сайты известны в данной области техники и описаны, например, Boackle, R.J., и др., Nature 282 (1979) 742-743; Lukas, T.J., и др., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., и Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., и др., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., и др., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., и др., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., и др., J. Virology 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., и др., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434. Такие связывающие сайты представляют собой, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии с EU-индексом Кэбот, Е.А., см. ниже). Антитела подкласса IgG1, IgG2 и IgG3 обычно проявляют активацию комплемента и C1q и C3 связывания, в то время как IgG4 не активирует систему комплемента и не связывает C1q и C3.

Что касается Соединения А, то термин “биспецифическая связывающая молекула” относится к молекуле, содержащей по меньшей мере одну Ang2-связывающую молекулу (или “Ang2-связывающий компонент”) и по меньшей мере одну VEGF-связывающую молекулу (или “VEGF-связывающий компонент”). Биспецифическая связывающая молекула может содержать больше

одной Ang2-связывающей молекулы и/или больше одной VEGF-связывающей молекулы, то есть в этом случае биспецифическая связывающая молекула содержит бипаратопную (как определено ниже) Ang2-связывающую молекулу и/или бипаратопную VEGF-связывающую молекулу, в части молекулы, которая связывается с Ang2 или с VEGF, то есть в ее “Ang2-связывающем компоненте” (или анти-Ang2 компоненте) или “VEGF-связывающем компоненте” (или анти-VEGF компоненте), соответственно. Тем не менее, слово “биспецифический” в этом контексте не следует рассматривать как исключаящее другие связывающие компоненты со связывающей специфичностью к другим молекулам, отличающимся от VEGF и Ang2 из биспецифической связывающей молекулы. Неограничивающими примерами таких других связывающих компонентов являются связывающие компоненты, которые связываются с сывороточным альбумином.

Если специально не указано иначе, термин “VEGF-связывающая молекула” или “Ang2-связывающая молекула” включает анти-VEGF или анти-Ang2 антитела, фрагменты анти-VEGF антител или анти-Ang2 антител”, “анти-VEGF антителоподобные молекулы” или “анти-Ang2 антителоподобные молекулы”, как описано в настоящей заявке, и конъюгаты с любыми из этих молекул. Антитела включают, но не ограничиваясь только ими, моноклональные и химерные моноклональные антитела. Термин “антитело” охватывает полные иммуноглобулины, такие как моноклональные антитела, продуцируемые с помощью рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, а также фрагменты антител или “антителоподобные молекулы”, включая одноцепочечные антитела и линейные антитела, так называемые “SMIP” (иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера, “Small Modular Immunopharmaceuticals”), как описано, например, в WO2002/056910; Антителоподобные молекулы включают одиночные переменные домены иммуноглобулинов, как описано в настоящей заявке. Другими примерами для антителоподобных молекул является антитела суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), или CDR-привитые молекулы.

“Ang2-связывающая молекула” или “VEGF-связывающая молекула” соответственно, относится как к моновалентным нацеленным связывающим молекулам (то есть молекулам, которые связываются с одним эпитопом соответствующей мишени), так и к би- или мультивалентным связывающим

молекулам (то есть связывающим молекулам, которые связываются более, чем с одним эпитопом, например, “бипаратопные” молекулы, как описано в настоящей заявке ниже). Ang2(или VEGF)-связывающие молекулы, содержащие больше одного Ang2(или VEGF)-связывающего одиночного переменного домена иммуноглобулина, также обозначаются как “форматированные” связывающие молекулы, они могут, в пределах компонента, связывающего мишень, дополнительно к одиночным переменным доменам иммуноглобулинов, включать линкеры и/или компоненты с эффекторными функциями, например, компоненты, увеличивающие период полужизни, такие как альбумин-связывающие одиночные переменные домены иммуноглобулинов, и/или партнер слияния, такой как сывороточный альбумин и/или присоединенный полимер, такой как PEG.

Термин “бипаратопная Ang2 (или VEGF)-связывающая молекула” или “бипаратопный одиночный переменный домен иммуноглобулина”, как используется в настоящей заявке, будет обозначать связывающую молекулу, содержащую первый одиночный переменный домен иммуноглобулина и второй одиночный переменный домен иммуноглобулина, как описано в настоящей заявке, где две молекулы связываются с неперекрывающимися эпитопами соответствующего антигена. Бипаратопные связывающие молекулы состоят из одиночных переменных доменов иммуноглобулинов, которые имеют различные специфичности к соответствующему эпитопу.

Форматированная связывающая молекула может, пусть даже и менее предпочтительно, также включать идентичные одиночные переменные домены иммуноглобулинов или два различных одиночных переменных домена иммуноглобулинов, которые распознают один и тот же или перекрывающиеся эпитопы или их соответствующий антиген. В этом случае, по отношению к VEGF, два одиночных переменных домена иммуноглобулинов могут связываться с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом на каждом из двух мономеров, которые образуют VEGF димер.

Эффективность биспецифической связывающей молекулы в соответствии с изобретением и композиций, которые ее содержат, можно тестировать с использованием любого подходящего анализа в условиях *in vitro*, анализа на основе клеток, анализа *in vivo* и/или животное модели, известной *per se*, или любой их комбинации, в зависимости от специфического заболевания или

нарушения, представляющего интерес. Подходящие анализы и животные модели будут понятными для квалифицированного специалиста в данной области техники, и они включают, например, анализы, описанные в EP 2 694 546 B1.

- Если специально не указано иначе, термины “иммуноглобулин” и “последовательность иммуноглобулина” – независимо от того, используются ли они в настоящей заявке по отношению к тяжелой цепи антитела или к обычному 4-х цепочечному антителу – используются в качестве общих терминов и включают как полноразмерное антитело, так и его индивидуальные цепи, а также все их части, домены или фрагменты (включая, но не ограничиваясь только ими, антигенсвязывающие домены или фрагменты, такие как VHH домены или VH/VL домены, соответственно). Дополнительно, термин “последовательность”, как используется в настоящей заявке (например, в таких терминах, как “последовательность иммуноглобулина”, “последовательность антитела”, “последовательность (единичного) переменного домена”, “VHH последовательность” или “белковая последовательность”) в целом должны пониматься как включающие как релевантную аминокислотную последовательность, так и последовательности нуклеиновых кислот или нуклеотидные последовательности, кодирующие такую же последовательность, если из контекста не требуется более ограниченная интерпретация.
- Термин “домен” (полипептида или белка), как используется в настоящей заявке, относится к свернутой белковой структуре, которая имеет способность сохранять его третичную структуру, независимо от остального белка. В целом, домены отвечают за дискретные функциональные свойства белков, и во многих случаях, могут быть добавлены, удалены или перенесены на другие белки без потери функции оставшейся части белка и/или домена.
- Термин “домен иммуноглобулина”, как используется в настоящей заявке, относится к глобулярному участку цепи антитела (такому как, например, цепь обычного 4-х цепочечного антитела или тяжелой цепи антитела), или к полипептиду, который по существу состоит из такого глобулярного участка.
- Домены иммуноглобулинов характеризуются тем, что они сохраняют свернутую иммуноглобулиновую характеристику молекул антител, которая состоит из 2-х слойного сэндвича из приблизительно 7 антипараллельных бета-цепей, упорядоченных в две бета-складчатые структуры, необязательно стабилизированные консервативной дисульфидной связью. Домен

иммуноглобулина содержит переменный (е) домен (ы), то есть один или несколько переменных доменов иммуноглобулина.

Термин “переменный домен иммуноглобулина”, как используется в настоящей заявке, обозначает домен иммуноглобулина, состоящий по существу из четырех “каркасных участков”, которые обозначаются в данной области техники и далее в настоящей заявке как “каркасный участок 1” или “FR1”; как “каркасный участок 2” или “FR2”; как “каркасный участок 3” или “FR3”; и как “каркасный участок 4” или “FR4”, соответственно; где эти каркасные участки прерваны тремя “участками, определяющими комплементарность” или “CDR”, которые обозначаются в данной области техники и далее в настоящей заявке как “участок, определяющий комплементарность 1” или “CDR1”; как “участок, определяющий комплементарность 2” или “CDR2”; и как “участок, определяющий комплементарность 3” или “CDR3”, соответственно. Таким образом, общая структура или последовательность переменного домена иммуноглобулина может быть представлена следующим образом: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Это переменный (е) домен (ы) иммуноглобулина, которые придают специфичность антителу к антигену путем обеспечения антигенсвязывающего сайта. Молекулы согласно настоящему изобретению включают одиночные переменные домены иммуноглобулинов, такие как VHH.

Термин “одиночный переменный домен иммуноглобулина”, как используется в настоящей заявке, обозначает переменный домен иммуноглобулина, который способен специфически связываться с эпитопом антигена без спаривания с дополнительным переменным доменом иммуноглобулина. Одним из примеров одиночных переменных доменов иммуноглобулинов в контексте настоящего изобретения являются “домены антител”, такие как одиночные переменные домены иммуноглобулинов VH и VL (VH домены и VL домены). Другим примером одиночных переменных доменов иммуноглобулинов являются “VHH домены” (или упрощенно “VHH”) из верблюжьих, как описано в настоящей заявке далее.

С учетом вышеизложенного определения, антигенсвязывающий домен обычного 4-х цепочечного антитела (такой как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE молекула; известная в данной области техники) или Fab фрагмента, F(ab')₂ фрагмента, Fv фрагмент, такой как связанный дисульфидной связью Fv или scFv фрагмент, или

диатело (все они известны в данной области техники), имеющие происхождение из такого обычного 4-х цепочечного антитела, не будут нормально рассматриваться как одиночный переменный домен иммуноглобулина, поскольку, в этих случаях, связывание с соответствующим эпитопом антигена нормально не будет происходить с помощью одного (одиночного) домена иммуноглобулина, а с помощью пары (ассоциированных) доменов иммуноглобулина, такой как переменные домены легкой и тяжелой цепи, то есть с помощью VH-VL пары доменов иммуноглобулинов, который совместно связываются с эпитопом соответствующего антигена.

“VHH домены”, также известные как VHH, V_HH домены, VHH фрагменты антител и VHH антитела, изначально были описаны как антигенсвязывающий (переменный) домен иммуноглобулина “тяжелой цепи антитела” (то есть “антител, лишенных легких цепей”; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 363, 446-448 (1993)). Термин “VHH домен” был выбран для возможности дифференцировать эти переменные домены от переменных доменов тяжелой цепи, которые присутствуют в обычных 4-х цепочечных антителах (которые обозначаются в настоящей заявке как “V_H домены” или “VH домены”) и от переменных доменов легкой цепи, которые присутствуют в обычных 4-х цепочечных антителах (которые обозначаются в настоящей заявке как “V_L домены” или “VL домены”). VHH домены специфически могут связываться с эпитопом без дополнительного антигенсвязывающего домена (в противоположность VH или VL доменам в обычном 4-х цепочечном антителе, в этом случае эпитоп распознается VL доменом совместно с VH доменом). VHH домены представляют собой небольшие, надежные и эффективные единицы распознавания антигена, образуемые одиночным доменом иммуноглобулина.

В контексте настоящего изобретения, термины VHH домен, VHH, V_HH домен, фрагмент VHH антитела, VHH антитело используются взаимозаменяемо и характеризуют одиночные переменные домены иммуноглобулинов (имеющие структуру FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и которые специфически связываются с эпитопом без необходимости присутствия второго переменного домена иммуноглобулина), и которые отличаются от VH доменов с помощью так

называемых “характерных остатков”, как определено в например, WO2009/109635, Фигура 1.

Аминокислотные остатки одиночного вариабельного домена иммуноглобулина, например, V_HH, пронумерованы в соответствии с общей нумерацией для V_H доменов, представленной Кэбот и др. (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, № публикации 91), как применяется к V_HH доменам из верблюдовых, как представлено, например, на Фигуре 2 Riechmann и Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). В соответствии с этой нумерацией

- FR1 включает аминокислотные остатки в положениях 1-30,
- CDR1 включает аминокислотные остатки в положениях 31-35,
- FR2 включает аминокислоты в положениях 36-49,
- CDR2 включает аминокислотные остатки в положениях 50-65,
- FR3 включает аминокислотные остатки в положениях 66-94,
- CDR3 включает аминокислотные остатки в положениях 95-102, и
- FR4 включает аминокислотные остатки в положениях 103-113.

Тем не менее, следует отметить, что – как хорошо известно в данной области техники для V_H доменов и для V_HH доменов – общее количество аминокислотных остатков в каждом из CDR может изменяться и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, указанных согласно номенклатуре Кэбота (то есть, одно или несколько положений в соответствии с номенклатурой Кэбота могут быть незанятыми в фактической последовательности, или фактическая последовательность может содержать один или несколько аминокислотных остатков, отличающегося от номера, разрешенного для номенклатуры Кэбота). Это обозначает, что, в целом, номенклатура в соответствии с Кэботом может соответствовать или может не соответствовать фактической нумерации аминокислотных остатков в фактической последовательности.

В данной области техники известны альтернативные методы для нумерации аминокислотных остатков V_H доменов, эти методы также могут применяться аналогичным образом к V_HH доменам. Тем не менее, в настоящем описании, пунктах формулы изобретения и фигурах, номенклатуру будут осуществлять в соответствии с Кэботом и применять к V_HH доменам, как описано выше, если специально не указано иначе.

Общее количество аминокислотных остатков в VHH домене обычно будет находиться в диапазоне от 110 до 120, часто в диапазоне между 112 и 115. Тем не менее, следует отметить, что более короткие и более длинные последовательности также могут быть подходящими для целей, описанных в
5 настоящей заявке.

Одиночные переменные домены иммуноглобулинов, например, VHH и домены антител, в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления изобретения, имеют много уникальных структурных признаков и функциональных свойств, что делает их чрезвычайно благоприятными для
10 применения в терапии в качестве функциональных антигенсвязывающих молекул. В частности, и не желая ограничиваться только этим, VHH домены (которые могут быть “созданы” по природе с функциональной точки зрения для связывания с антигеном без спаривания с переменным доменом легкой цепи), могут функционировать в качестве одиночных, относительно небольших,
15 функциональных антигенсвязывающих структурных единиц.

Дальнейшие подробности и информация относительно преимуществ одиночных переменных доменов иммуноглобулинов и относительно получения VHH описаны более подробно в EP 2 694 546 B1.

Одиночные переменные домены иммуноглобулинов в соответствии с
20 изобретением не ограничиваются в отношении специфического биологического источника, из которого они были получены, или в отношении специфического метода получения. Подходящие методы и технологии для получения VHH доменов, связывающихся со специфическим антигеном или эпитопом, были описаны в WO2006/040153 и WO2006/122786.

В соответствии со специфическими вариантами осуществления, одиночные переменные домены иммуноглобулинов в соответствии с изобретением представляют собой VHH домены с аминокислотной последовательностью, которая по существу соответствует аминокислотной последовательности встречающегося в природе VHH домена, но которая была “гуманизирована” или
30 “последовательность-оптимизирована” (необязательно после созревания аффинности), то есть путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанной встречающейся в природе VHH последовательности на один или несколько аминокислотных остатков, который (е) встречается (ются) в соответствующем (их) положении

(ях) в вариабельном тяжелом домене обычного 4-х цепочечного антитела из организма человека. Это можно осуществлять с помощью методов, известных в данной области техники, которые могут быть широко использованы квалифицированным специалистом в данной области техники.

5 Гуманизированный VHH домен может содержать один или несколько полностью человеческих последовательностей каркасного участка, и, в еще более специфическом варианте осуществления, может содержать последовательности каркасного участка человека, имеющие происхождение из Vh3 последовательности зародышевой линии человека DP-29, DP-47, DP-51, или их
10 частей, или являться высоко гомологичными к ним, необязательно в комбинации с JH последовательностями, такими как JH5. Таким образом, протокол гуманизации может включать замену любого из VHH остатков на соответствующие остатки каркасного участка 1, 2 и 3 (FR1, FR2 и FR3) генов VH зародышевой линии, таких как DP 47, DP 29 и DP 51), либо отдельно или в
15 комбинации. Подходящие каркасные участки (FR) одиночных вариабельных доменов иммуноглобулинов в соответствии с изобретением могут быть выбраны из тех, которые описаны, например, в WO2006/004678 и специфически, включают так называемые классы “KERE” и “GLEW”. Примерами являются одиночные вариабельные домены иммуноглобулинов, имеющие
20 аминокислотную последовательность G-L-E-W в приблизительных положениях 44 - 47, и их соответствующие гуманизированные противоположные части. Гуманизированный VHH домен может содержать одну или несколько полностью человеческую последовательностей каркасного участка.

В качестве примера, гуманизирующая замена для VHH, относящихся к 103 P,R,S-группе и/или GLEW-группе (как определено ниже), представляет собой
25 108Q - 108L. Способы гуманизации одиночных вариабельных доменов иммуноглобулинов известны в данной области техники.

Связывающие одиночные вариабельные домены иммуноглобулинов с улучшенными свойствами в отношении терапевтического применения,
30 например, усиленная аффинность или сниженная иммуногенность, могут быть получены из индивидуальных связывающих молекул с помощью методик, хорошо известных в данной области техники, таких как созревание аффинности (например, используя в качестве исходных синтетические, случайные или встречающиеся в природе последовательности иммуноглобулинов), CDR

прививание, гуманизация, комбинирование фрагментов, имеющих происхождение из различных последовательностей иммуноглобулинов, ПЦР сборка, используя перекрывающиеся праймеры, и сходных методик для конструирования последовательностей иммуноглобулинов, которые хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники; или любой подходящей комбинации любой из вышеизложенной методики, также обозначаемые термином “оптимизация последовательности”, как описано в настоящей заявке. Можно привести ссылку, например, на стандартные руководства, а также как раскрыто в дальнейшем описании и примерах.

В соответствии с изложенным выше, в предпочтительном варианте осуществления, одиночные вариабельные домены иммуноглобулинов Соединения А представляют собой VHH домены. Более предпочтительно, Соединение А выбирают из соединений, имеющих следующие аминокислотные последовательности:

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISK
GGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLR
LADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG
FTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG
LVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSV
KGRFTISSDNSKNTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYD
AWGQGTLLTVSS

(SEQ ID NO: 11);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKG
GYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRL
ADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF
TFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL
QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVK
GRFTISSDNSKNTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDA
WGQGTLLTVSS

(SEQ ID NO: 12); и

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKG
GYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRL

ADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGF
 TFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL
 QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL
 VQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVK
 5 GRFTISSDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDA
 WGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 13).

- Три последовательности, представленные выше, являются практически идентичными, за исключением N-концевой последовательности, которая может
- 10 быть изменена или модифицирована для оптимальной адаптации последовательности к выбранной экспрессионной системе (экспрессионный вектор, клетка-хозяин) или по другим причинам. Таким образом, для квалифицированного специалиста в данной области техники является понятным, что другие полипептиды, которые включают по существу вышеуказанную
- 15 последовательность, но которые незначительно модифицированы, например, путем аминокислотных замен, делеций или добавлений, не изменяют способностей к связыванию полученных полипептидов, также будут являться пригодными в качестве "Соединения А" фармацевтической комбинации в соответствии с изобретением.
- 20 В другом варианте осуществления, типичные представители класса одиночных переменных доменов иммуноглобулина, связывающих VEGF и/или Ang2 согласно изобретению, имеют аминокислотные последовательности, которые соответствуют аминокислотной последовательности встречающегося в природе VH домена, который был "камелизирован", то есть путем замены одного или
- 25 нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности встречающейся в природе переменной тяжелой цепи из обычного 4-х цепочечного антитела на один или несколько аминокислотных остатков, которые встречаются в соответствующем (их) положении (ях) одном в VH домене тяжелой цепи антитела. Это может быть осуществлено с помощью метода,
- 30 известного *per se*, который понятен для квалифицированного специалиста в данной области техники, и ссылка дополнительно может быть приведена на WO1994/04678. Такая камелизация предпочтительно может осуществляться в аминокислотных положениях, которые присутствуют в области контакта VH-VL и в так называемых характерных верблюжьих остатках (Camelidae Hallmark)

(см., например, также WO1994/04678). Подробное описание таких методик “гуманизации” и “камелизации” и предпочтительные последовательности каркасных участков, согласующихся с ними, можно дополнительно найти, например, на сс. 98 из WO2006/040153 и сс. 107 из WO2006/122786.

5 PD-1 антагонист в контексте настоящего изобретения и всех его вариантах осуществления представляет собой соединение, которое ингибирует взаимодействие PD-1 с его рецептором (ами). PD-1 антагонисты хорошо известны в данной области техники, например, обзор представлен Li и др., *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1151 (включен в настоящую заявку путем ссылки). Любой PD-1 антагонист, в особенности антитела, такие как описанные Li и др., а также другие антитела, описанные в настоящей заявке ниже, можно использовать в соответствии с изобретением. Предпочтительно, PD-1 антагонист согласно настоящему изобретению и во всех его вариантах осуществления выбирают из группы, включающей следующие антитела:

- 15 - пембролизумаб (анти-PD-1 антитело);
- ниволумаб (анти-PD-1 антитело);
- пидилизумаб (анти-PD-1 антитело);
- PDR-001 (анти-PD-1 антитело);
- PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, и PD1-5, как описано в настоящей заявке
- 20 ниже (анти-PD-1 антитела)
- атезолизумаб (анти-PD-L1 антитело);
- авелумаб (анти-PD-L1 антитело);
- дурвалумаб (анти-PD-L1 антитело).

Пембролизумаб (ранее также известен как ламбролизумаб; торговое наименование Keytruda; также известен как MK-3475), описанный, например, в Hamid, O. и др. (2013) *New England Journal of Medicine* 369(2):134-44, представляет собой гуманизированное IgG4 моноклональное антитело, которое связывается с PD-1; он содержит мутацию в C228P, созданную для предотвращения Fc-опосредованной цитотоксичности. Пембролизумаб описан,

25 например, в US 8,354,509 и WO2009/114335. Он получил разрешение FDA для лечения пациентов, страдающих от нерезектабельной или метастатической меланомы и пациентов с метастатическим NSCLC.

Ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4; BMS-936558 или MDX1106b) представляет собой полностью человеческое IgG4 моноклональное

антитело, которое специфически блокирует PD-1, в котором отсутствует обнаруживаемая антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Ниволумаб описан, например, в US 8,008,449 и WO2006/121168. Он получил разрешение FDA для лечения пациентов, страдающих от нерезектабельной или метастатической меланомы, метастатического NSCLC и распространённой почечно-клеточной карциномы.

Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное IgG1k моноклональное антитело, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб описан, например, в WO2009/101611.

PDR-001 или PDR001 представляет собой высокоаффинное, лиганд-блокирующее, гуманизированное анти-PD-1 IgG4 антитело, которое блокирует связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1. PDR-001 описано в WO2015/112900 и WO2017/019896.

Антитела PD1-1 - PD1-5 представляют собой молекулы антител, определяемые последовательностями, как показано в Таблице 1, где HC представляет собой (полноразмерную) тяжелую цепь и LC представляет собой (полноразмерную) легкую цепь:

Таблица 1:

SEQ ID NO:	Название последовательности	Аминокислотная последовательность
14	HC из PD1-1	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLG
15	LC из PD1-1	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSIPA RFGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
16	HC из PD1-2	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLG
17	LC из PD1-2	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSIPA RFGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

SEQ ID NO:	Название последовательности	Аминокислотная последовательность
		LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	HC из PD1-3	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSSAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHAEALHNYHTQKSLSLSLG
19	LC из PD1-3	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	HC из PD1-4	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSSAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHAEALHNYHTQKSLSLSLG
21	LC из PD1-4	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
22	HC из PD1-5	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSSAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHAEALHNYHTQKSLSLSLG
23	LC из PD1-5	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Специфически, молекула анти-PD-1 антитела, описанная выше, имеет:

(PD1-1:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15; или

(PD1-2:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; или

(PD1-3:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19; или

5 (PD1-4:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; или

(PD1-5:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23.

10 Атезолизумаб (Tecentriq, также известен как MPDL3280A) представляет собой производное фага человеческого IgG1k моноклональное антитело, нацеленное на PD-L1, и оно описано, например, в Deng и др. mAbs 2016;8:593-603. Он получил разрешение FDA для лечения пациентов, страдающих от уротелиальной карциномы.

15 Авелумаб представляет собой полностью человеческое анти-PD-L1 IgG1 моноклональное антитело и он описан, например, в Boyerinas и др. Cancer Immunol. Res. 2015;3:1148-1157.

Дурвалумаб (MEDI4736) представляет собой человеческое IgG1k моноклональное антитело с высокой специфичностью к PD-L1 и он описан, например, в Stewart и др. Cancer Immunol. Res. 2015;3:1052-1062 или в Ibrahim и др. Semin. Oncol. 2015;42:474-483.

20

Другие PD-1 антагонисты, описанные Li и др. (выше), или известные как проходящие клинические исследования, такие как AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), REGN2810, BMS-936559, JS001-PD-1, SHR-1210, BMS-936559, TSR-042, JNJ-63723283, MEDI4736, MPDL3280A, и MSB0010718C, могут использоваться в качестве альтернативы или дополнительно к вышеуказанным антагонистам.

25

Международные непатентованные названия (INN), как используется в настоящей заявке, также охватывают все биоаналогичные антитела, имеющие такие же, или по существу такие же, аминокислотные последовательности, как и исходное антитело, включая, но не ограничиваясь только ими, те биоаналогичные антитела, которые разрешены к использованию согласно 42 USC §262 подраздел (k) в US и эквивалентных регуляциях в других юрисдикциях.

30

PD-1 антагонисты, перечисленные выше, известные в данной области техники, также известно их соответствующее приготовление, терапевтическое применение и свойства.

5 В одном варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой пембролизумаб.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой ниволумаб.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой пидилизумаб.

10 В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой атезолизумаб.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой авелумаб.

15 В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой дурвалумаб.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой PDR-001.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой PD1-1.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой PD1-2.

20 В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой PD1-3.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой PD1-4.

В другом варианте осуществления PD-1 антагонист представляет собой PD1-5.

25 В контексте настоящего изобретения следует принять во внимание, что комбинации, композиции, наборы, методы, применения или соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением могут охватывать одновременное, конкурентное, последовательное, одно за одним, попеременное или раздельное введение активных агентов или компонентов. Следует иметь в виду, что биспецифическая связывающая молекула и PD-1 антагонист могут вводиться в виде препарата либо зависимо или независимо, таким образом, 30 например, что биспецифическая связывающая молекула и PD-1 антагонист может вводиться либо в виде части одной и той же фармацевтической композиции/дозированной формы или, предпочтительно, в раздельных фармацевтических композициях/дозированных формах.

В этом контексте, “комбинация” или “комбинированный” в настоящем изобретении включает, но не ограничиваясь только ими, продукт, который получают в результате смешивания или комбинирования больше одного активного агента и включает как фиксированные, так и нефиксированные (например, свободные) комбинации (включая наборы) и применения, такие как, например, одновременное, конкурентное, последовательное, одно за одним, попеременное или раздельное применение компонентов или агентов. Термин “фиксированная комбинация” обозначает, что активные агенты оба вводятся пациенту одновременно в форме единого целого или дозировки. Термин “нефиксированная комбинация” обозначает, что активные агенты оба вводятся пациенту в виде отдельных самостоятельных единиц либо одновременно, конкурентно или последовательно при отсутствии каких-либо специфических ограничений по времени, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применяется к коктейльной терапии, например, введению трех или более активных агентов.

Введение биспецифической связывающей молекулы / Соединения А и PD-1 антагониста / Соединения В может осуществляться путем совместного введения активных компонентов или агентов, как, например, путем их введения одновременно или конкурентно в одном единственном или в двух раздельных препаратах или дозированных формах. Альтернативно, введение биспецифической связывающей молекулы и PD-1 антагониста можно осуществлять путем введения активных компонентов или агентов последовательно или попеременно, как, например, в двух раздельных препаратах или дозированных формах.

Например, одновременное введение включает введение по существу в одно и то же время. Такая форма введения также может обозначаться как “сопутствующее” введение. Конкурентное введение включает введение активных агентов в пределах одного и того же общего периода времени, например, в один день (дни), но не обязательно в одно и то же время. Попеременное введение включает введение одного агента в течение периода времени, например, на протяжении нескольких дней или недели, с последующим введением другого агента в течение последующего периода времени, например на протяжении нескольких дней или недели, и после этого повторение схемы в

течение одного или нескольких циклов. Последовательное или одно за одним введение включает введение одного агента в течение первого периода времени (например, на протяжении нескольких дней или недели), используя одну или несколько доз, с последующим введением другого агента в течение второго периода времени (например, на протяжении нескольких дней или недели), используя одну или несколько доз. Также можно применять перекрывающуюся схему, которая включает введение активных агентов в различные дни на протяжении периода лечения, но не обязательно в соответствии с регулярной последовательностью. Также можно применять вариации для этих общих рекомендаций, например, в соответствии с используемыми агентами и состоянием субъекта.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления, в способе в соответствии с настоящим изобретением, Соединение А, как описано в настоящей заявке, вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или раздельно с Соединением В, как описано в настоящей заявке. В сходном предпочтительном варианте осуществления, Соединение А, как описано в настоящей заявке для применения в способе в соответствии с настоящим изобретением, вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или раздельно с Соединением В, как описано в настоящей заявке. В связанном предпочтительном варианте осуществления, Соединение В, как описано в настоящей заявке для применения в способе в соответствии с настоящим изобретением, вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или раздельно с Соединением А, как описано в настоящей заявке. В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления, обеспечивается применение Соединения А, как описано в настоящей заявке, где Соединение А вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или раздельно с Соединением В. В дальнейшем связанном предпочтительном варианте осуществления, обеспечивается применение Соединения В, как описано в настоящей заявке, где Соединение В вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или раздельно с Соединением А. В другом варианте осуществления, обеспечивается набор в соответствии с настоящим изобретением, где первую фармацевтическую композицию вводят

одновременно, конкурентно, последовательно, одну за одной, переменнo или раздельно со второй фармацевтической композицией.

Предпочтительные пути введения для Соединения А, Соединения В или обоих соединений, вводимых раздельно или одновременно, включают, но не ограничиваясь только ими, оральное, энтеральное, парентеральное (например, внутримышечная, внутривенная, внутривенная, трансдермальная или подкожная инъекция, или имплант), назальное, вагинальное, ректальное или местное введение. В предпочтительном варианте осуществления, путь введения представляет собой внутривенное введение, в особенности внутривенную инфузию или инъекцию. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены, отдельно или совместно, в подходящих дозированных единичных препаратах, содержащих общепринятые нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, наполнители и/или заполнители, подходящие для каждого пути введения. Более предпочтительно, препараты включают твердые, полутвердые или жидкие дозированные формы, такие как лиофилизация, жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Предпочтительный путь зависит от предназначенного пути введения и терапевтического применения. Особенно предпочтительные варианты осуществления включают жидкие препараты и лиофилизацию. В случае лиофилизации, лиофилизат может быть восстановлен в жидкости, предпочтительно в воде.

Соединения, как описано в настоящей заявке может вводиться ежедневно, 5 раз в неделю, 3 раз в неделю, 2 раз в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели. Предпочтительные интервалы введения включают один раз в неделю и один раз в 2 недели.

Предпочтительно, Соединения А и В вводят один раз в неделю путем в/в инфузии.

Схема введения может включать длительное лечение. Под “длительным” понимают продолжительность по меньшей мере две недели и предпочтительно, несколько недель, месяцев или лет. Квалифицированный специалист в данной области техники может определить необходимые модификации в этой схеме дозирования, используя только общепринятые эксперименты на основании сведений, раскрытых в настоящей заявке. См. Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ред. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. Дозировка также

может быть скорректирована лечащим врачом в случае любого осложнения. Введение может быть ежедневным, каждый второй день, каждый третий день, каждый четвертый день, один день в неделю, два дня в неделю, один день через две недели, один день через три недели, и т.д.

- 5 Соединения, как описано в настоящей заявке, могут вводиться в терапевтически эффективных количествах в единичных или разделенных дозах, вводимых через подходящие временные интервалы. Терапевтически эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимому для достижения желательного терапевтического результата, и
- 10 представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, ослабления или лечения заболевания или нарушения. Терапевтически эффективное количество соединений в соответствии с настоящим изобретением может изменяться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, и способность соединения вызывать
- 15 желательную ответную реакцию у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или неблагоприятные эффекты соединения перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. Терапевтически эффективная доза предпочтительно ингибирует изменяемый параметр, например, скорость роста
- 20 опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% относительно нелеченных субъектов или относительно предшествующего нелеченного периода у того же самого субъекта, который
- 25 подвергается лечению.

Активные соединения могут вводиться в таких дозах, которые являются терапевтически эффективными при монотерапии, или в таких дозах, которые являются более низкими или более высокими по сравнению с дозами, применяемыми при монотерапии, но в комбинации приводят к желательному

30 (совместно) терапевтически эффективному количеству. Количество биспецифических связывающих молекул в соответствии с изобретением, необходимое для применения для лечения, может быть адаптировано для конкретной выбранной связывающей молекулы, пути введения, природы состояния, подвергаемого лечению, и возраста и состояния пациента, и в

конечном итоге находится на усмотрении лечащего врача или клинициста. Также, дозировка связывающих молекул в соответствии с изобретением может быть адаптирована в зависимости от целевой клетки, опухоли, ткани, трансплантата или органа.

- 5 Желательная доза Соединения А или Соединения В может вводиться в виде фиксированного количества на введение или в виде болюса, для достижения установленной концентрации в крови у пациента.

Введение Соединения В, PD-1 антагониста, как описано в настоящей заявке, может осуществляться, например, путем инъекции (например, подкожно или
10 внутривенно) в дозе от приблизительно 0,1 до 30 мг/кг веса тела пациента, например, от приблизительно 0,5 до 25 мг/кг веса тела пациента, от приблизительно 1 до 20 мг/кг веса тела пациента, от приблизительно 2 до 5 мг/кг веса тела пациента, или приблизительно 3 мг/кг веса тела пациента.

Дозировки и терапевтические схемы PD-1 антагониста могут быть определены
15 квалифицированным специалистом в данной области техники. Предпочтительные схемы дозирования для PD-1 антагониста в соответствии с изобретением включают 1 мг/кг веса тела хозяина или 3 мг/кг веса тела хозяина путем внутривенного введения, с применением антитела, которое вводят с использованием одной из следующих схем дозирования: (I) каждые четыре
20 недели для шести дозировок, затем каждые три месяца; (II) каждые три недели; (III) 3 мг/кг веса тела хозяина один раз, с последующим 1 мг/кг веса тела хозяина каждые три недели. В определенных вариантах осуществления, PD-1 антагонист вводят путем инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе от приблизительно 1 до 40 мг/кг веса тела хозяина, например, от 1 до 30
25 мг/кг веса тела хозяина, например, от приблизительно 5 до 25 мг/кг веса тела хозяина, от приблизительно 10 до 20 мг/кг веса тела хозяина, приблизительно от 1 до 5 мг/кг веса тела хозяина, от 1 до 10 мг/кг веса тела хозяина, от 5 до 15 мг/кг веса тела хозяина, от 10 до 20 мг/кг веса тела хозяина, от 15 до 25 мг/кг веса тела хозяина, или приблизительно 3 мг/кг веса тела хозяина. Схема
30 дозирования может изменяться, например, от одного раза в неделю до одного раза каждые 2, 3, или 4 недели. В одном варианте осуществления, PD-1 антагонист вводят в дозе от приблизительно 10 до 20 мг/кг веса тела хозяина один раз в две недели. Молекула антитела может вводиться путем внутривенной инфузии со скоростью более, чем 20 мг/мин, например, 20-40 мг/мин, и типично

больше, чем или равно 40 мг/мин для достижения дозы от приблизительно 35 до 440 мг/м², типично от приблизительно 70 до 310 мг/м², и более типично, от приблизительно 110 до 130 мг/м². В вариантах осуществления, скорость инфузии от приблизительно 110 до 130 мг/м² обеспечивает уровень приблизительно 3

5 мг/кг веса тела хозяина. В других вариантах осуществления, молекула антитела может вводиться путем внутривенной инфузии со скоростью меньше, чем 10 мг/мин, например, меньше, чем или равной 5 мг/мин для достижения дозы от приблизительно 1 до 100 мг/м², например, от приблизительно 5 до 50 мг/м², от приблизительно 7 до 25 мг/м², или, приблизительно 10 мг/м². В некоторых

10 вариантах осуществления, антитело инфузируется в течение периода времени приблизительно 30 минут. Следует принять во внимание, что значения дозировок могут изменяться в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего облегчению. Следует дополнительно принять во внимание, что для любого конкретного субъекта, специфические режимы дозирования будут

15 корректироваться в динамике в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным суждением лица, осуществляющего введение или контролирующего введение композиций, и что интервалы дозирования, раскрытые в настоящей заявке, являться только примерными и не предназначены для ограничения объема или практической реализации заявленной композиции.

20 Схема дозирования Соединения А и Соединения В, отдельно или вместе, может изменяться, например, от одного раза в неделю до одного раза каждые 2, 3 или 4 недели. В определенном варианте осуществления, введенное количество или дозировка Соединения А, Соединения В, или обоих соединений, будет ниже (например, по меньшей мере ниже на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей

25 мере 40%, или по меньшей мере 50%). В других вариантах осуществления, количество или дозировка Соединения А, Соединения В, или обоих соединений, которое (ая) обеспечивает желательный результат (например, лечение гиперпролиферативного или онкологического заболевания) будет ниже (например, по меньшей мере ниже на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей

30 мере 40%, или по меньшей мере 50%).

Способ, соединения, соединения для применения, применения соединений, фармацевтическая композиция и набор в соответствии с настоящим изобретением включает введение субъекту комбинация биспецифической

молекулы антитела и молекулы анти-PD-1 антитела, как описано в настоящей заявке.

В зависимости от онкологического заболевания, подвергаемого лечению, комбинированная терапия, как описано в настоящей заявке, может использоваться самостоятельно или в дополнительной комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, в особенности, выбранными из химиотерапевтических средств или терапевтически активных соединений, которые ингибируют ангиогенез, пути передачи сигналов или митотические контрольные точки в злокачественных клетках.

Дополнительное терапевтическое средство может вводиться одновременно с, необязательно в качестве компонента того же самого фармацевтического препарата, или перед или после введения связывающей молекулы и/или PD1 антагониста.

Химиотерапевтическое средство может быть выбрано из гормонов, гормональных аналогов и антигормональных средств (например, тамоксифен, торемифен, ралоксифен, фулвестрант, мегестрол ацетат, флутамид, нилутамид, бикалутамид, ципротерона ацетат, финастерид, бусерелина ацетат, флудрокортисон, флуоксиместерон, медроксипрогестерон, октреотид, арзоксифен, пасиреотид, вапреотид), ингибиторов ароматазы (например, анастрозол, летрозол, лиарозол, эксеместан, атаместан, форметан), агонистов и антагонистов LHRH (например, гозерелина ацетат, лейпролид, абареликс, цетрореликс, деслорелин, гистрелин, трипторелин), антиметаболитов (например, антифолаты, такие как метотрексат, пеметрексед, аналоги пиримидина, такие как фторурацил, капецитабин, децитабин, неларабин, и гемцитабин, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин, флударабин); противоопухолевых антибиотиков (например, антрациклины, такие как доксорубин, даунорубин, эпирубин и идарубин, митомицин-С, блеомицин, дактиномицин, пликамицин, митоксантрон, пиксантрон, стрептозоцин); производных платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, лобоплатин, сатраплатин); алкилирующих агентов (например, эстрамустин, мехлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, гидроксимочевина, темозоломид, нитрозомочевины, такие как кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотических агентов (например, алкалоиды барвинка,

такие как винбластин, виндезин, винорелбин, винфлюнин и винкристин; и таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел и их препараты, ларотаксел; симотаксел, и эпотилоны, такие как иксабепилон, патупилон, ZK-EPO); ингибиторов топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как этопозид и этопифос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан) и различных химиотерапевтических средств, такие как амифостин, анагредид, интерферон альфа, прокарбазин, митотан, и порфимер, бексаротен, целекоксиб.

В предпочтительном варианте осуществления, лечение, задействующее Соединение А и Соединение В, дополнительно включает "двухкомпонентную терапию на основе препаратов платины", то есть терапию с применением (I) соединения платины с цисплатином или карбоплатином, плюс (II) химиотерапевтический агент третьего поколения, такой как доцетаксел, паклитаксел, винорелбин, или гемцитабин.

В другом предпочтительном варианте осуществления, лечение, задействующее Соединение А и Соединение В, комбинируют с терапией, нацеленной на раковые клетки.

В определенных вариантах осуществления, онкологическое или гиперпролиферативное заболевание, в особенности злокачественное новообразование или опухолевое заболевание, которое лечат с применением комбинированной терапии, как описано в настоящей заявке, включает, но не ограничиваясь только ими, солидную опухоль, опухоль системы крови (например, лейкоз, лимфому, миелому, например, множественную миелому), и метастатическое поражение. В одном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль. Примеры солидных опухолей включают злокачественные опухоли, например, саркомы и карциномы, например, аденокарциномы различных систем органов, такие как те, которые поражают легкие, молочную железу, яичники, лимфоидный, желудочно-кишечный (например, ободочную кишку), задний проход, половые органы и мочеполовой тракт (например, почки, уротелиальный, клетки мочевого пузыря, предстательной железы), глотки, ЦНС (например, головного мозга, нервных или глиальных клеток), головы и шеи, кожи (например, меланома) и поджелудочной железы, а также аденокарциномы, который включают злокачественные опухоли, такие как рак ободочной кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточная карцинома, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, рак тонкого кишечника

и рак пищевода. Злокачественное новообразование может находиться на ранней, промежуточной, поздней стадии или может представлять собой метастатическое злокачественное новообразование.

Как используется в настоящей заявке, "гиперпролиферативное заболевание" относится к состояниям, при которых рост клеток повышается выше нормальных уровней. Например, гиперпролиферативные заболевания или нарушения включают злокачественные заболевания (например, рак пищевода, рак ободочной кишки, рак жёлчных протоков) и не-злокачественные заболевания (например, атеросклероз, доброкачественная гиперплазия, доброкачественная гипертрофия предстательной железы).

В одном варианте осуществления, злокачественное новообразование выбирают из группы, включающей рак легких (например, NSCLC (например, NSCLC с плоскоклеточной и/или неплоскоклеточной гистологией, или NSCLC аденокарцинома)), меланому (например, прогрессирующую меланому), рак почки (например, почечно-клеточную карциному), рак печени, миелому (например, множественную миелому), рак предстательной железы, рак молочной железы (например, рак молочной железы, который не экспрессирует один, два или все из рецепторов эстрогена, рецептора прогестерона, или Her2/neu, например, трижды негативный рак молочной железы), колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рак анального канала, рак желудка и пищевода, рак щитовидной железы, рак шейки матки, лимфопролиферативное заболевание (например, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание) или опухоль системы крови, Т-клеточную лимфому, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, или лейкоз (например, миелоидный лейкоз или лимфоидный лейкоз).

В другом варианте осуществления, злокачественное новообразование выбирают из карциномы (например, прогрессирующей или метастатической карциномы), меланомы или карциномы легких, например, NSCLC.

В одном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой рак легких, например, NSCLC или мелкоклеточный рак легких. В предпочтительном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой NSCLC.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, комбинируемом с любым аспектом и вариантом осуществления изобретения, комбинированная терапия в соответствии с настоящим изобретением предназначена для лечения пациента, страдающего от местнораспространенного или метастатического неплоскоклеточного NSCLC без EGFR мутации или ALK транслокации. В этом отношении, необязательно, пациента выбирают в соответствии с его/ее экспрессионным статусом PD-L1, таким как высокий или низкий экспрессионный статус PD-L1. Лечение может представлять собой лечение первой линии, то есть первое лечение, получаемое в связи с заболеванием (NSCLC). Таким образом, пациент может не подвергаться химиотерапии или лучевой терапии, в частности, не для лечения NSCLC при лечении в соответствии с изобретением. Путем определения экспрессионного статуса PD-L1 перед любым лечением злокачественного новообразования у пациента, можно получить надежные результаты.

Экспрессионный статус PD-L1 можно определить, как описано Han и др. (Journal of Pathology and Translational Medicine 2017; 51: 40-48) или Wang и др. (OncoTargets and Therapy 2016;9 5023–5039), например, путем применения иммуногистохимии. Образец биопсии опухоли пациента, подвергаемого лечению, можно использовать для определения экспрессионного статуса PD-L1.

Можно использовать единичную биопсию опухоли или множественные биопсии от индивидуального пациента, в том случае, если используют больше одной биопсии, предпочтительно биопсию с наивысшей экспрессией PD-L1 используют для определения экспрессионного статуса PD-L1 в соответствии с изобретением. PD-L1 можно определять на клеточной поверхности (мембранный) или цитоплазматическую экспрессию, экспрессия только опухолевыми клетками и/или другими клетками в опухолевом окружении (например, иммунными клетками). Пороговые значения для рассматривания положительной PD-L1 экспрессии могут составлять, например, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5% или по меньшей мере 10% PD-L1 экспрессии в клетках, например, опухолевых и/или иммунных клеток, где образцы с $\geq 1\%$, $\geq 5\%$ или $\geq 10\%$ PD-L1 экспрессией в клетках, например, как определено с помощью иммуногистохимии, могут рассматриваться как PD-L1 “положительные”. В предпочтительном варианте осуществления, экспрессионный статус PD-L1 определяют на опухолевых клетках или иммунных клетках, более

предпочтительно на опухолевых клетках, где PD-L1 экспрессия в 1% - 5% клеток рассматривается как низкая PD-L1 экспрессия и PD-L1 экспрессия в >5% клеток, например, >5% до 40% клеток, рассматривается как высокая PD-L1 экспрессия, как выше предпочтительно определяют с помощью иммуногистохимии, например, как описано Han и др. или Wang и др. Пациенты, подвергаемые лечению, могут представлять собой пациентов с низкой PD-L1 экспрессией, пациентов с высокой PD-L1 экспрессией, пациентов с низкой PD-L1 экспрессией, исключая пациентов с высокой PD-L1 экспрессией, или пациентов с высокой PD-L1 экспрессией, исключая пациентов с низкой PD-L1 экспрессией.

В одном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, распространенную меланому. В одном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой распространенную или нерезектабельную меланому, которая не отвечает на другие терапии. В других вариантах осуществления, злокачественное новообразование представляет собой меланому с BRAF мутацией (например, BRAF V600 мутацией).

В другом варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой гепатокарциному, например, распространенную гепатокарциному, с или без вирусной инфекции, например, хронического вирусного гепатита.

В другом варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой рак предстательной железы, например, распространенный рак предстательной железы.

В еще другом варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой миелому, например, множественную миелому.

В еще другом варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой рак почки, например, почечно-клеточную карциному (RCC) (например, метастатическую RCC или светлоклеточную почечно-клеточную карциному (CCRCC)).

Как указано выше, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей Соединение А и Соединение В, как описано в настоящей заявке, и к набору, содержащему первую фармацевтическую композицию, включающую Соединение А, как описано в настоящей заявке, и

вторую фармацевтическую композицию, включающую Соединение В, как описано в настоящей заявке.

Термин “фармацевтическая композиция”, как описано в настоящей заявке, относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить
5 эффективно реализовывать биологическую активность действующего вещества, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить композицию. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может вводиться с помощью различных методов, известных в данной области
10 техники. Как будет понятно для квалифицированного специалиста в данной области техники, путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желательных результатов.

Независимо от выбранного пути введения, соединения, используемые в комбинированной терапии согласно настоящему изобретению и/или
15 фармацевтической композиции, первую фармацевтическую композицию и вторую фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, приготавливают в фармацевтически приемлемых дозированных формах с помощью общепринятых методов, известных квалифицированному специалисту в данной области техники.

Набор, как описано в настоящей заявке, может включать подходящий контейнер или несколько подходящих контейнеров, содержащих первую
20 фармацевтическую композицию и/или вторую фармацевтическую композицию, где первая и вторая фармацевтическая композиция могут содержаться в одном и том же контейнере или в различных контейнерах. Набор можно использовать в
25 любом методе или любых применениях согласно изобретению.

Предпочтительно, набор в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит листок-вкладыш в упаковке, включающий читабельные инструкции для применения Соединения А и/или Соединения В для лечения и/или предотвращения онкологического или гиперпролиферативного
30 заболевания, предпочтительно злокачественного новообразования или опухолевого заболевания, в особенности NSCLC, пациенту, который в этом нуждается. Инструкции могут обеспечивать дополнительно более подробное описание, как раскрыто выше, по отношению к способу согласно изобретению и любому из его предпочтительных вариантов осуществления.

Использование терминов в единственном числе, при использовании с термином “включающий” в пунктах формулы изобретения и/или описании, может обозначать “один”, но он также согласуется со значением “один или несколько”, “по меньшей мере один”, и “один или несколько, больше одного”.

- 5 “Приблизительно”, как используется в настоящей заявке, обозначает приемлемую долю погрешности для измеренного количества, принимая во внимание природу точности измерений. Типичные доли погрешностей находятся в диапазоне 20%, типично в диапазоне 10%, и более типично в диапазоне 5% данного значения или интервала значений.
- 10 Термин “лечить” или “лечение”, как используется в настоящей заявке, обозначает лечение уже существующего болезненного состояния или условия или повышение вероятности восстановления из болезненного состояния или условия. Лечение также может включать ингибирование, то есть остановку развития болезненного состояния или условия, и облегчение, то есть вызывание
- 15 регрессии или замедление прогрессирования заболевания. Лечение также может охватывать облегчение симптомов заболевания без излечения пациента.
- Термин “предотвратить” или “предотвращение”, как используется в настоящей заявке, не обозначает остановку возникновения болезненного состояния или условия, развивающегося у пациента или субъекта, полностью, но может
- 20 относиться к уменьшенному риску развития болезненного состояния или условия.
- Настоящее изобретение в дальнейшем иллюстрируется с помощью последующих примеров, не являясь обязательно ограниченным этими вариантами осуществления изобретения. Пример или его часть, включая соединения,
- 25 дозировки и пути введения, а также комбинации для лечения, каждый как таковой или в комбинации с более подробным описанием выше, составляет часть изобретения.

Примеры

Сокращения и аббревиатуры

	CD	Кластер дифференцировки
	DMEM	модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
5	FCS	Фетальная телячья сыворотка
	ID	Идентификатор
	в/б	внутрибрюшинный
	LAG-3	Ген активации лимфоцитов 3
	М	Молярный
10	MEM	Минимальная питательная среда
	PBS	Забуференный фосфатом физиологический раствор
	PD-1	Запрограммированная смерть клетки 1
	PD-L1	Лиганд запрограммированной смерти клетки 1
	PD-L2	Лиганд запрограммированной смерти клетки 2
15	q3 или 4d	каждый 3ий или 4ый день (два раза в неделю)
	R	Ответ
	TGI	Ингибирование роста опухоли, рассчитанное в соответствии с формулой: $TGI = 100 \times \{ 1 - [(\text{последний день лечения} - \text{день лечения } 1) / (\text{последний контрольный день} - \text{контрольный день } 1)] \}$
20	TIL	Лимфоциты, инфильтрирующие опухоли

Пример 1

Тестируемые соединения

Для этих экспериментов использовали крысиное IgG2a анти-мышиное PD-1 антитело EX101359 (клон RMP1-14) (10 мг/кг), биспецифический, VEGF и Ang2 связывающий белок VEGFANGBII22 (имеющий структуру/последовательность, как определено в настоящей заявке выше и в SEQ ID NO:11, 12 и 13), низкомолекулярный TKI ваталаниб и CrossMab антитело вануцизумаб (анти-человеческий VEGF-A и анти-человеческий/мышиный Ang-2). Для контрольной группы, использовали соответствующий изотип к PD-1 антителу Rat IgG2a (EX101362) (10 мг/кг), то есть антитело, которое имеет сходную последовательность, но не связывается с PD-1. Все антитела разводили в 1x PBS и получали от BioXcell, West Lebanon, NH, USA.

15 *Клетки*

LL/2(LLC1) представляла собой мышиную клеточную линию карциномы легких, которую покупали в Американской коллекции типовых культур (ATCC), USA (CRL-1642). Клетки культивировали в T175 в колбах для культивирования тканей при 37°C и 5% CO₂. Используемой средой являлась DMEM, дополненная 10% FCS (HyClone® охарактеризованная фетальная телячья сыворотка; № кат. SH30071.03; от Thermo Scientific). Культуры расщепляли каждые два-три дня при соотношении 1:4/1:6.

Мыши

25 C57BL/6NTac представляет собой полностью иммунокомпетентный мышиный штамм, который поставляется Taconic Denmark. Самки мышей доставляли от Taconic в возрасте 7 недель в местный виварий. После прибытия в виварий, мышам предоставляли возможность адаптироваться к условиям по меньшей мере в течение 5 дней перед их использованием в экспериментах. Их содержали в группах по 10 животных в стандартных условиях при температуре 21,5 +/- 1,5 C и влажности 55 +/- 10%. Обеспечивали стандартное питание (PROVIMI KLIBA) и автоклавированную водопроводную воду *ad libitum*. Подкожные микроципы, имплантированные под изофлурановой анестезией, использовали для идентификации каждой мыши. Карточки на клетках показывали номер

исследования, идентификационный номер животного, антитело и соединение и уровни дозирования, путь введения, а также, схему, оставшуюся с животным для всего исследования.

5 *Перевивание опухолей, рандомизация*

Животных распределяли случайно с помощью компьютерной программы SEPIA на различные группы. Для развития подкожной опухолевой модели, LL/2 клетки собирали, ресуспендировали в PBS/5% FCS и смешивали с 1:2 с Matrigel Matrix (без факторов роста, Corning, Tewksbury, MA, USA) в количестве 5×10^5 /мл. 100 мкл клеточной суспензии, содержащей 5×10^4 клеток, инъецировали на мышь (день-5).

Введение тестируемого соединения

Антитела разводили в PBS до концентрации 1 мг/мл и инъецировали внутривентриально в объеме 10 мл/кг. Разведение выдерживали при 4°C максимально в течение 5 дней. Началом лечения (день 1) быть 3 день после инъекции клеток. Ваталаниб суспендировали в 5% растворе Natrosol (Гидроксиэтилцеллюлоза) и вводили внутривентриально через желудочный зонд (Infusionskanüle Olive A, Acufirm, № 14 64 II-1). Вводимый объем составлял 10 мл на кг веса тела. Введение осуществляли один раз каждые 24 часа. Для приготовления суспензии, соединение добавляли к раствору Natrosol и смесь перемешивали в течение ночи. В некоторых случаях необходимо воздействие ультразвука. Растворы выдерживали при комнатной температуре в темноте максимально в течение 1 недели.

25

Таблица 2: Группы лечения

Группа	К-во мышей	Соединение (я) для осуществления лечения	Доза [мг/кг]	Схема	Путь
1	10	- Изотип PD-1 антитело (EX101362)	10 мг/кг	q3 или 4d	в/б
2	10	- анти-мышинное PD-1 антитело (EX101359)	10 мг/кг	q3 или 4d	в/б
3	10	- VEGFANGBII22	15 мг/кг	q3 или 4d	в/б
4	10	- Ваталаниб (EXBF003)	100 мг/кг	qd	п/о

Группа	К-во мышей	Соединение (я) для осуществления лечения	Доза [мг/кг]	Схема	Путь
5	10	- анти-мышинное PD-1 антитело (EX101359); - VEGFANGBII22; - Ваталаниб (EXBF003)	10 мг/кг, 15 мг/кг, 100 мг/кг	q3 или 4d, qd	в/б, п/о
6	10	- анти-VEGF/Ang2 антитело (вануцизумаб);	15 мг/кг	q3 или 4d	в/б
7	10	- анти-мышинное PD-1 антитело (EX101359); - анти-VEGF/Ang2 антитело (вануцизумаб); - Ваталаниб (EXBF003)	10 мг/кг, 15 мг/кг, 100 мг/кг	q3 или 4d, qd	в/б, п/о

Наблюдение за ростом опухоли и прогрессированием заболевания

Диаметры опухолей измеряли три раза в неделю (понедельник, среда и пятница) с помощью штангенциркуля. С дня 14 до дня 28 после начала лечения, все опухоли измеряли ежедневно. Объем каждой опухоли [в мм³] рассчитывали в соответствии с формулой “объем опухоли = длина * диаметр² * пи/6.” Для мониторинга побочных эффектов лечения, мышей обследовали ежедневно для обнаружения отклонений от нормы и вес тела определяли по меньшей мере три раза в неделю. Животных умертвляли, когда размер опухоли достигал 1500 мм³ или некроз опухоли был больше, чем 1/3 опухолевой поверхности. Дополнительно, животных с потерей веса тела > 18 % подвергали эвтаназии по этическим соображениям. Значения ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали следующим образом:

$$TGI = 100 \times \{1 - [(последний \text{ день лечения} - \text{день лечения}_1) / (последний \text{ контрольный день} - \text{контрольный день}_1)]\}$$

Статистический анализ – противоопухолевая эффективность

Для оценки статистической достоверности ингибирования опухоли, осуществляли односторонний непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, основанный на гипотезе, что эффект может быть измерен только в одном направлении (то есть ожидание ингибирования опухоли, а не стимуляции опухоли). В этом случае, с помощью критерия Вилкоксона и др. сравнивали расстановку индивидуальных опухолей из двух групп, в соответствии с абсолютным объемом в конкретный день (попарное сравнение между группами). Анализ осуществляли в день 17 эксперимента. р-значения, полученные из

критерия Вилкоксона, корректировали, используя поправку Бонферрони-Холма. Считается, что p -значения $\leq 0,05$ указывают на достоверность отличий.

Результаты

- Мышей в изотопной контрольной группе лечили два раза в неделю с применением EX101362 внутривентриально. Во время периода лечения опухоли вырастали от среднего объема 41 мм³ до объема 1275 мм³. Лечение с применением 10 мг/кг EX101359, анти-мышинного PD-1 антитела, вводили два раза в неделю внутривентриально. EX101359-лечение уменьшало рост опухоли по сравнению с изотипным контролем (средний TGI = 51%).
- Лечение с применением VEGFANGBII22 отдельно приводило к 49%. Лечение с применением ваталаниба отдельно приводило к TGI 54%. Комбинированное лечение с применением ваталаниба, VEGFANGBII22 и анти-PD1 приводило к TGI 79%.
- Лечение с применением вануцизумаба отдельно приводит к TGI 64%.
- Комбинированное лечение с применением ваталаниба, вануцизумаба и анти-PD1 приводит к TGI 81%.
- Дальнейшие результаты комбинаций и результаты сравнительных соединений представлены на Фигуре 1.

Вывод

- В этом исследовании, монотерапии с применением анти-PD1, ваталаниба (нацеливающий на VEGFR), VEGFANGBII22 и вануцизумаба проявляют от минимальной до средней противоопухолевой ответной реакции со значениями TGI 51%, 54%, 49% и 64%, соответственно. Трехкомпонентные комбинации лекарственных средств анти-PD1 плюс ваталаниб плюс VEGFANGBII22 или анти-PD1 плюс ваталаниб плюс вануцизумаб были заметно более эффективными со значениями TGI 79% и 81%. Путем анализа соответствующих кривых индивидуальных опухолей, трехкомпонентная комбинация лекарственных средств анти-PD1 плюс ваталаниб плюс VEGFANGBII22 выделяется на фоне остальных, так как одна из леченных опухолей проявляла уменьшение размеров, в то время как все опухоли в группе, леченной с применением анти-PD1 плюс ваталаниб плюс вануцизумаб, проявили уменьшенный рост опухоли.
- Трехкомпонентные комбинации лекарственных средств продемонстрировали лучший противоопухолевый эффект по сравнению с изотипным контролем и

монотерапиями. Трехкомпонентная комбинация лекарственных средств анти-PD1 плюс ваталаниб плюс VEGFANGBII22 даже индуцировала уменьшение размеров опухоли у одного леченного индивидуума. Все лечения хорошо переносились в этом эксперименте.

- 5 На основании вышеизложенного, следует принять во внимание, что, при переносе этих результатов на терапию у людей, соединение VEGFANGBII22 будет включать анти-Ang2, а также анти-VEGF активность, поскольку это соединение связывается с человеческим VEGF. Таким образом, дополнительное применение анти-VEGF агента, такого как ваталаниб, в вышеописанном
- 10 эксперименте, не будет необходимым. Следовательно, представленные выше данные указывают на то, что лечение людей с применением VEGFANGBII22 плюс PD1 антагонист, такой как анти-PD1 антитело, будет обеспечивать пригодные терапевтические эффекты у пациентов-людей.

15 **Пример 2**

- Осуществляли дальнейший эксперимент, составленный по существу, как описано в Примере 1, для сравнения монотерапий с трёхкомпонентной комбинацией лекарственных средств VEGFANGBII22 плюс анти-PD1 антитело
- 20 плюс ваталаниб (с ваталанибом против мимикрирующей анти-VEGF активности у мышей, где такая активность не может предполагаться для VEGFANGBII22, поскольку VEGF связывающий компонент этого соединения не связывается с мышинным VEGF).

- 25 Как и в предыдущем примере, определяли значения TGI, где 80% достигается при введении трехкомпонентной комбинаций. В отличие от этого, TGI значения 22% (анти-PD-1 антитело), 27% (анти-Ang2 активность VEGFANGBII22) и 43% (ваталаниб) достигали с помощью монотерапий.

- 30 Дополнительно, определяли выживание мышей в соответствующей леченной группе. Как можно увидеть на Фигуре 2, только лечение с применением VEGFANGBII22, ваталаниба и PD1 антагониста обеспечивает выживание, достоверное за пределами 30 дневного диапазона. Как и в предыдущем примере, это свидетельствует о том, что предложенное лечение может, как предполагают,

обеспечивать предположительно превосходящие эффекты также у людей (аналогично подразумевается, что анти-VEGF активность уже будет обеспечиваться посредством VEGFANGBII22 компонента, поэтому отсутствует необходимость добавления ваталаниба).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения онкологического или гиперпролиферативного заболевания, включающий введение пациенту, который в этом нуждается,

а) терапевтически эффективного количества Соединения А и

б) терапевтически эффективного количества Соединения В,

где

Соединение А представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, включающую

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF,

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий

сывороточный альбумин, и

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2,

где

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,

связывающий VEGF, имеет следующие CDR последовательности:

CDR1: SYSMG (SEQ ID NO: 1),

CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG (SEQ ID NO: 2),

CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY (SEQ ID NO: 3);

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,

связывающий сывороточный альбумин, имеет следующие CDR

последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 4),

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 5),

CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 6);

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,

связывающий Ang2, имеет следующие CDR последовательности:

CDR1: DYAIG (SEQ ID NO: 7),

CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8),

CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA (SEQ ID NO: 9); и

где

Соединение В представляет собой PD-1 антагонист.

2. Способ по пункту 1, где онкологическое или гиперпролиферативное заболевание представляет собой злокачественное или опухолевое заболевание.
3. Способ по пункту 1 или 2, где онкологическое или гиперпролиферативное
5 заболевание представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).
4. Способ по любому из пунктов 1 - 3, где указанные одиночные
вариабельные домены иммуноглобулинов Соединения А представляют собой
VHH домены.
- 10 5. Способ по любому из пунктов 1 - 4, где Соединение А имеет
аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 11, SEQ ID
NO:12 или SEQ ID NO:13.
- 15 6. Способ по любому из пунктов 1 - 5, где PD-1 антагонист представляет
собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.
7. Способ по пункту 6, где анти-PD-1 антитело выбирают из группы,
включающей пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, PD1-1, PD1-2, PD1-3,
20 PD1-4, и PD1-5.
8. Способ по пункту 6, где анти-PD-L1 антитело выбирают из группы,
включающей атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб.
- 25 9. Способ по любому из пунктов 1 - 8, где Соединение А вводят
одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или
раздельно с Соединением В.
10. Соединение А, как определено в любом из пунктов 1, 4 или 5, для
30 применения в способе лечения или предотвращения онкологического или
гиперпролиферативного заболевания, предпочтительно злокачественного
новообразования или опухолевого заболевания, особенно предпочтительно
NSCLC, указанный способ включает введение Соединения А в комбинации с

Соединением В пациенту, который в этом нуждается, где Соединение В имеет значение, как определено в любом из пунктов 1 и 6 - 8.

11. Соединение А для применения по пункту 10, где Соединение А вводят
одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или
раздельно с Соединением В.

12. Соединение В, как определено в любом из пунктов 1 и 6 - 8, для
применения в способе лечения или предотвращения онкологического или
гиперпролиферативного заболевания, в особенности злокачественного
новообразования или опухолевого заболевания, в особенности NSCLC,
указанный способ включает введение Соединения В в комбинации с
Соединением А пациенту, который в этом нуждается, где Соединение А имеет
значение, как определено в любом из пунктов 1, 4 или 5.

13. Соединение В для применения по пункту 12, где Соединение В вводят
одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или
раздельно с Соединением А.

14. Применение Соединения А, как определено в любом из пунктов 1, 4 или 5,
для приготовления фармацевтической композиции для лечения или
предотвращения онкологического или гиперпролиферативного заболевания,
предпочтительно злокачественного новообразования или опухолевого
заболевания, более предпочтительно NSCLC, где Соединение А используют в
комбинации с Соединением В, где Соединение В имеет значение, как
определено в любом из пунктов 1 и 6 - 8.

15. Применение Соединения А по пункту 14, где Соединение А вводят
одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или
раздельно с Соединением В.

16. Применение Соединения В, как определено в любом из пунктов 1 и 6 - 8,
для приготовления фармацевтической композиции для лечения или
предотвращения онкологического или гиперпролиферативного заболевания,

предпочтительно злокачественного новообразования или опухолевого заболевания, более предпочтительно NSCLC, где Соединение В используют в комбинации с Соединением А, где Соединение А имеет значение, как определено в любом из пунктов 1, 4 или 5.

5

17. Применение Соединения В по пункту 16, где Соединение В вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одно за одним, переменнo или раздельно с Соединением А.

10 18. Фармацевтическая композиция, включающая

а) Соединение А и

б) Соединение В

где

Соединение А представляет собой биспецифическую связывающую молекулу,
15 включающую

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF,
одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий
сывороточный альбумин, и
одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2

20 где

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,
связывающий VEGF, имеет следующие CDR последовательности:

CDR1: SYSMG (SEQ ID NO: 1),

CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG (SEQ ID NO: 2),

25 CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY (SEQ ID NO: 3);

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,
связывающий сывороточный альбумин, имеет следующие CDR
последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 4),

30 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 5),

CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 6);

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина,
связывающий Ang2, имеет следующие CDR последовательности:

CDR1: DYAIG (SEQ ID NO: 7),

CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8),
 CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA (SEQ ID NO: 9); и

где

5 Соединение В представляет собой PD-1 антагонист.

19. Фармацевтическая композиция по пункту 18, где указанные одиночные
 переменные домены иммуноглобулинов Соединения А представляют собой
 VHH домены.

10

20. Фармацевтическая композиция по пункту 18 или 19, где Соединение А
 имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 11,
 SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13.

15 21. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 18 - 20, где PD-1
 антагонист представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

22. Фармацевтическая композиция по пункту 21, где анти-PD-1 антитело
 выбирают из группы, включающей пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб,
 20 PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

23. Фармацевтическая композиция по пункту 22, где анти-PD-L1 антитело
 выбирают из группы, включающей атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб.

25 24. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 18 - 23, которая
 дополнительно включает один или несколько фармацевтически приемлемых
 носителей, наполнителей и/или заполнителей.

30 25. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 18 - 24 для
 применения в способе лечения и предотвращения онкологического или
 гиперпролиферативного заболевания, предпочтительно злокачественного
 новообразования или опухолевого заболевания, более предпочтительно NSCLC.

26. Набор, содержащий

- а) первую фармацевтическую композицию, включающую Соединение А, и
- б) вторую фармацевтическую композиция, включающую Соединение В,

где

5 Соединение А представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, включающую

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF, одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, и

10 одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2 где

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий VEGF, имеет следующие CDR последовательности:

CDR1: SYSMG (SEQ ID NO: 1),

15 CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG (SEQ ID NO: 2),

CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY (SEQ ID NO: 3);

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, имеет следующие CDR последовательности:

20 CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 4),

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 5),

CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 6);

указанный одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий Ang2, имеет следующие CDR последовательности:

25 CDR1: DYAIG (SEQ ID NO: 7),

CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 8),

CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA (SEQ ID NO: 9); и

где

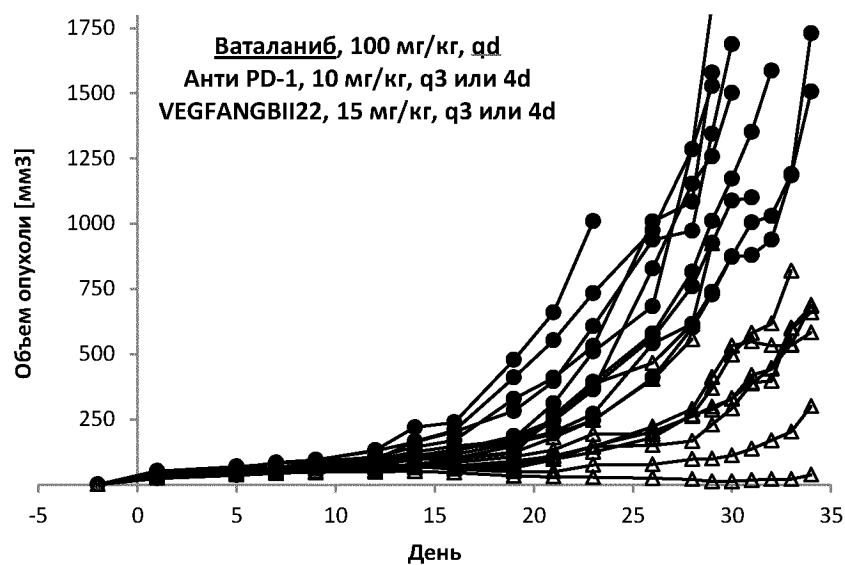
30 Соединение В представляет собой PD-1 антагонист.

27. Набор по пункту 26, где указанные одиночные вариабельные домены иммуноглобулинов Соединения А представляют собой VHH домены.

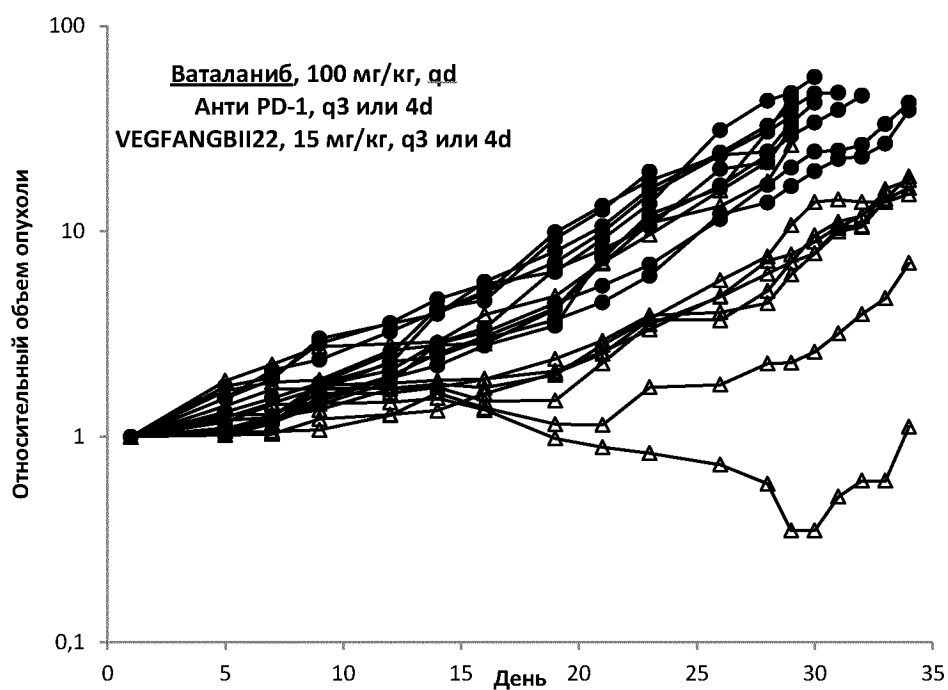
28. Набор по пункту 26 или 27, где Соединение А имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:12, или SEQ ID NO:13.
- 5 29. Набор по любому из пунктов 26 - 28, где PD-1 антагонист представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.
30. Набор по пункту 29, где анти-PD-1 антитело выбирают из группы, включающей пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, PD1-1, PD1-2, PD1-3, 10 PD1-4 и PD1-5.
31. Набор по пункту 29, где анти-PD-L1 антитело выбирают из группы, включающей атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб.
- 15 32. Набор по любому из пунктов 26 – 31, который дополнительно включает листок-вкладыш в упаковке, содержащий читабельные инструкции для одновременного, конкурентного, последовательного, одного за одним, попеременного или раздельного введения пациенту для лечения или предотвращения онкологического или гиперпролиферативного заболевания, 20 предпочтительно злокачественного новообразования или опухолевого заболевания, особенно предпочтительно NSCLC, пациенту, который в этом нуждается.

1/3
Фигура 1

a)

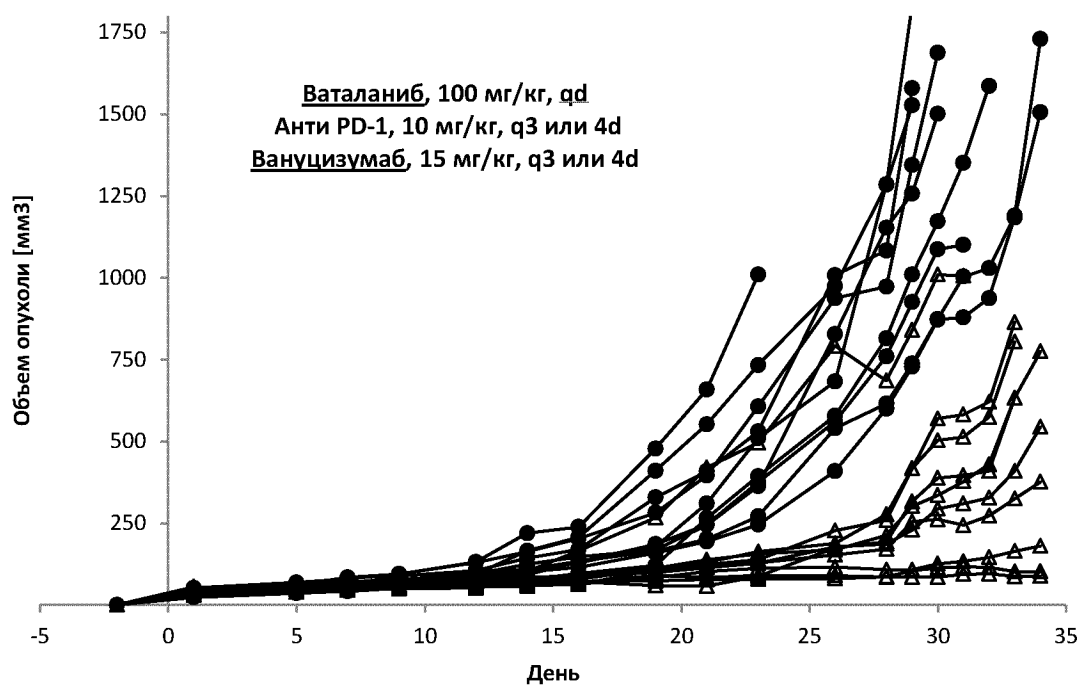


b)

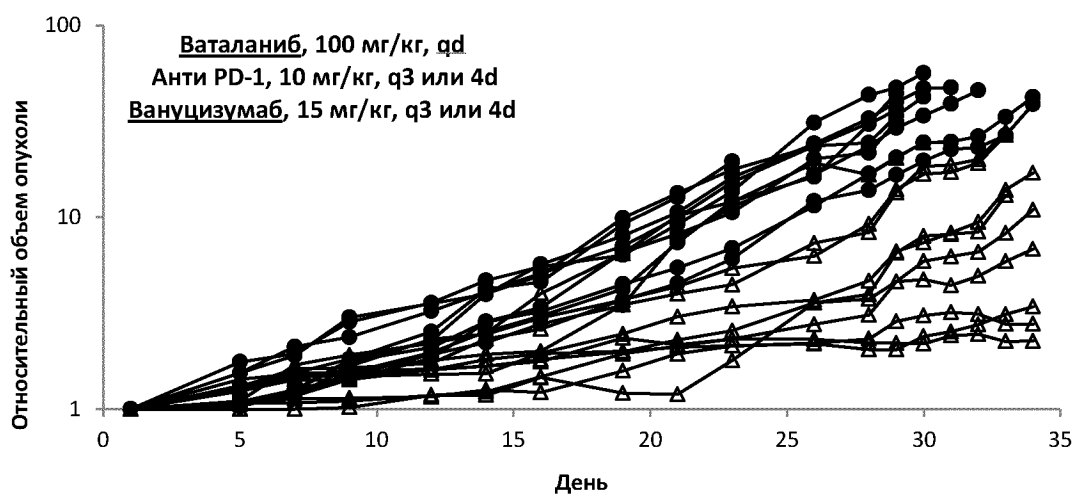


Фигура 1 (продолжение)

с)



d)



Фигура 2

