

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090505** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.05.13

**(54) ИММУНОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПУТЕМ НАРУШЕНИЯ
ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ PD-1/PD-L1**

(31) **61/647,442; 61/790,747**

(32) **2012.05.15; 2013.03.15**

(33) **US**

(62) **201492105; 2013.05.13**

(71) Заявитель:
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Когсвелл Джон П., Голдберг Стэси М.,
Гупта Ашок К., Джуре-Кункел Мария,
Ван Си Тао, Виггинтон Джон М. (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В. (RU)**

(57) Описан способ иммунотерапии пациента со злокачественной опухолью, включающий введение пациенту антитела, которое ингибирует передачу сигналов от сигнального пути PD-1/PD-L1, или комбинации такого антитела и антитела к CTLA-4. В настоящем изобретении также предусмотрен способ иммунотерапии пациента со злокачественной опухолью, включающий выбор пациента, который представляет собой подходящего кандидата для иммунотерапии, основанный на оценке того, что в исследуемом образце ткани от пациента доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает заданный пороговый уровень, и введение антитела к PD-1 выбранному субъекту. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены кроличьи моноклональные антитела, которые специфически связываются с экспрессированным на клеточной поверхности антигеном PD-L1 в образце ткани FFPE, и автоматизированный способ ИНС для оценки экспрессии на клеточной поверхности в FFPE тканях с использованием предусмотренных антител к PD-L1.

A2

202090505

202090505

A2

ИММУНОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПУТЕМ НАРУШЕНИЯ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ PD-1/PD-L1

ОПИСАНИЕ

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 61/647442, поданной 15 мая 2012 г., и предварительной заявкой на выдачу патента США № 61/790747, поданной 15 марта 2013 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В настоящей заявке различные другие публикации представляют собой ссылки в скобках посредством имени автора и даты или номера патента или публикации патента. Полное название для этих публикаций может быть найдено в конце описания непосредственно перед формулой изобретения. Раскрытие этих публикаций полностью включено в настоящее описание посредством ссылки в настоящую заявку для того, чтобы более полно описать состояние настоящего уровня техники, известного специалистам в настоящей области техники по состоянию на дату настоящего изобретения, описанного и заявленного в настоящем документе. Тем не менее, цитата ссылки не должна быть истолкована как признание того, что такая ссылка представляет собой известный уровень техники по настоящему изобретению.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам иммунотерапии пациента со злокачественной опухолью, включающим введение пациенту антител, которые разрушают сигнальный путь PD-1/PD-L1. Биомаркер может быть использован как часть этого лечения для идентификации подходящих пациентов для иммунотерапии и для прогнозирования эффективности анти-PD-1 лечения.

Уровень техники

Злокачественные опухоли человека скрывают многочисленные генетические и эпигенетические изменения, создавая неоантигены, потенциально узнаваемые иммунной системой (Sjoblom *et al.*, 2006). Адаптивная иммунная система, состоящая из Т- и В-лимфоцитов, характеризуется мощным противораковым потенциалом с широкой возможностью и совершенной специфичностью отвечать на различные

опухолевые антигены. Кроме того, иммунная система демонстрирует значительную пластичность и компонент памяти. Успешное освоение всех этих атрибутов адаптивной иммунной системы сделает иммунотерапию уникальной среди всех способов лечения злокачественной опухоли. Тем не менее, хотя эндогенный иммунный ответ на злокачественную опухоль наблюдается в доклинических моделях и у пациентов, этот ответ неэффективен, и установленные злокачественные опухоли рассматриваются как "собственные" и переносятся иммунной системой. Внося вклад в это состояние толерантности, опухоли могут использовать несколько различных механизмов для того, чтобы активно подорвать противоопухолевый иммунитет. Эти механизмы включают в себя дисфункциональную передачу сигналов Т-клетками (Mizoguchi *et al.*, 1992), супрессию регуляторных клеток (Facciabene *et al.*, 2012), а также кооптацию эндогенных "иммунных контрольных точек", которые служат для понижающего модулирования интенсивности адаптивных иммунных реакций и защиты нормальных тканей от сопутствующего повреждения опухолями для того, чтобы избежать иммунного разрушения (Toralian *et al.*, 2011; Mellman *et al.*, 2011).

До недавнего времени иммунотерапия злокачественных опухолей не сосредотачивала значительные усилия на подходах, которые усиливают противоопухолевые иммунные ответы с помощью адоптивного переноса активированных эффекторных клеток, иммунизации против соответствующих антигенов или обеспечения неспецифических иммунных стимулирующих средств, таких как цитокины. В последнее десятилетие, однако, интенсивные усилия по разработке специфических ингибиторов путей иммунных контрольных точек начали обеспечивать новые иммунотерапевтические подходы для лечения злокачественной опухоли, включающие в себя создание антитела (Ab), ипилимумаба (YERVOY®), который связывает и ингибирует антиген-4 цитотоксического Т-лимфоцита (CTLA-4) для лечения пациентов с прогрессирующей меланомой (Hodi *et al.*, 2010) и, как описано в настоящем документе, разработку антител, которые блокируют ингибиторный путь PD-1.

Programmed Death-1 (PD-1) представляет собой ключевой рецептор иммунной контрольной точки, экспрессируемый активированными Т- и В-клетками и опосредующий иммуносупрессию. PD-1 представляет собой представителя семейства рецепторов CD28, которое включает в себя CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 и BTLA. Были идентифицированы два лиганда гликопротеинов клеточной поверхности для PD-1, Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) и Programmed Death Ligand-2 (PD-L2), которые экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках, а также на многих

злокачественных опухолях человека, и было показано, что они подавляют активацию Т-клеток и секрецию цитокинов после связывания с PD-1 (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). В отличие от CTLA-4, PD-1 в первую очередь функционирует в периферических тканях, где активированные Т-клетки могут столкнуться с иммуносупрессирующими лигандами PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), экспрессируемыми опухолевыми и/или стромальными клетками (Flies *et al.*, 2011; Topalian *et al.*, 2012a). Ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 опосредует мощную противоопухолевую активность в доклинических моделях (патент США № 8008449 и 7943743), а также использование антител-ингибиторов взаимодействия PD-1/PD-L1 для лечения злокачественной опухоли вступило в клинические испытания (Brahmer *et al.*, 2010; Topalian *et al.*, 2012b; Brahmer *et al.*, 2012; Flies *et al.*, 2011; Pardoll, 2012; Hamid and Carvajal, 2013).

Перспектива новой области персонализированной медицины представляет собой то, что прогресс в фармакогеномике будет увеличивать использование специально разработанных лечебных средств для определенной субпопуляции и, в конечном счете, отдельных пациентов, в целях повышения эффективности и минимизации негативных последствий. Недавние успехи включают в себя, например, разработку иматиниба мезилата (GLEEVEC®), белка-ингибитора тирозинкиназы, который ингибирует тирозинкиназу bcr-abl, для лечения положительного по филадельфийской хромосоме хронического миелолейкоза (CML); кризотиниба (XALKORI®) для лечения 5% пациентов с поздней стадией немелкоклеточного рака легких, которые экспрессируют ген мутантной киназы анапластической лимфомы (ALK), и вемурафениба (ZELBORAF®), ингибитора мутировавшего белка B-RAF (V600E-BRAF), который экспрессируется приблизительно в половине опухолей меланомы. Однако, в отличие от клинической разработки низкомолекулярных средств, которые нацелено воздействуют на отдельные активирующие мутации, найденные в некоторых популяциях злокачественных опухолей, особенно актуальной для иммунотерапии злокачественных опухолей представляет собой идентификация механизма на основе прогностических биомаркеров для выбора пациента и направления на контроль лечения. Достижения в проверке экспрессии PD-L1 в качестве биомаркеров для скрининга пациентов для анти-PD-1 иммунотерапии описаны в настоящем документе.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предусмотрен способ иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства, которое нарушает, снижает или подавляет передачу сигналов от ингибиторного иммунорегулятора. Согласно предпочтительным вариантам осуществления средство представляет собой антитело. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления ингибиторный иммунорегулятор представляет собой компонент сигнального пути PD-1/PD-L1. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антитело нарушает взаимодействие между PD-1 и PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению или антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению представляет собой ниволумаб (BMS-936558) и антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению представляет собой BMS-936559. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект предварительно подвергали лечению от злокачественной опухоли. Согласно другим вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой прогрессирующую, метастатическую и/или не поддающуюся лечению злокачественную опухоль. Согласно предпочтительным вариантам осуществления введение антитела или антигенсвязывающего участка субъекту индуцирует длительную клиническую реакцию у субъекта.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (а) выбор субъекта, который представляет собой подходящего кандидата для иммунотерапии, выбор, включающий (i) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, (ii) оценку доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, и (iii) выбор субъекта в качестве подходящего кандидата на основе оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает заданный пороговый уровень; и (b) введение композиции, содержащей терапевтически эффективное

количество средства, которое нарушает передачу сигналов от пути PD-1/PD-L1, например, антитела к PD-1 или к PD-L1 выбранному субъекту.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (а) выбор субъекта, который не подходит для иммунотерапии со средством, которое нарушает передачу сигнала от пути PD-1/PD-L1, например, антителом к PD-1 или к PD-L1, выбор, включающий (i) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, (ii) оценку доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, и (iii) выбор субъекта в качестве не подходящего для указанной иммунотерапии на основе оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, меньше, чем заданный пороговый уровень; и (b) введение стандартного лекарственного средства, отличного от средства, которое нарушает передачу сигналов от пути PD-1/PD-L1, выбранному субъекту.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ выбора пациента со злокачественной опухолью для иммунотерапии со средством, которое нарушает передачу сигналов от пути PD-1/PD-L1, например, антителом к PD-1 или к PD-L1, включающий: (а) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) оценку исследуемого образца ткани для определения в нем доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (c) сравнение доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, с заданным пороговым уровнем; и (d) выбор пациента для иммунотерапии, основанный на оценке того, что PD-L1 экспрессируется в клетках исследуемого образца ткани.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ прогнозирования терапевтической эффективности средства, которое нарушает передачу сигналов от пути PD-1/PD-L1, например, антитела к PD-1 или к PD-L1, для лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий: (а) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемого образца ткани, содержащего опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) оценку исследуемого образца ткани для

определения в нем доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (с) сравнение доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, с заданным пороговым уровнем; и (d) выбор прогнозируемой эффективности средства, причем, если доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности превышает пороговый уровень, прогнозируется, что средство будет эффективно в лечении пациента, и причем, если доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности ниже порогового уровня, прогнозируется, что средство не будет эффективно при лечении пациента.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ для определения иммунотерапевтического режима, включающего средство, которое нарушает передачу сигналов от пути PD-1/PD-L1, например, антитело к PD-1 или к PD-L1, для пациента со злокачественной опухолью, включающий: (a) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемого образца ткани, содержащего опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) оценку исследуемого образца ткани для определения в нем доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (с) сравнение доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, с заданным пороговым уровнем; и (d) определение иммунотерапевтического режима, содержащего средство, на основе определения того, что доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает заданный пороговый уровень.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанных в настоящем документе способов исследуемый образец ткани представляет собой фиксированный в формалине и заключенный в парафин (FFPE) образец. Согласно некоторым другим вариантам осуществления оценка доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, достигается путем иммуногистохимического (ИHC) окрашивания образца FFPE. Согласно предпочтительным вариантам осуществления моноклональное антитело 28-8 или 5H1 используется в автоматизированном анализе ИHC для связывания с PD-L1 на клеточной поверхности в исследуемом образце ткани. Согласно предпочтительным вариантам осуществления любого из описанных в настоящем документе способов злокачественная опухоль представляет собой меланому (MEL), почечно-клеточную карциному (PCC), плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплоскоклеточный NSCLC, колоректальный рак (CRC), кастрационно-резистентный

рак предстательной железы (CRPC), гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК), плоскоклеточный рак головы и шеи, карциномы пищевода, яичников, желудочно-кишечного тракта и молочной железы или гематологические злокачественные опухоли, такие как множественная миелома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома и хронический миелолейкоз.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрено моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывается с экспрессированным на клеточной поверхности антигеном PD-L1 человека в образце ткани FFPE. Согласно предпочтительным вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок не связывается с цитоплазматическим антигеном PD-L1 в образце ткани FFPE. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления моноклональное антитело (mAb) представляет собой кроличье моноклональное антитело, обозначенное 28-8, 28-1, 28-12, 29-8 или 20-12, или мышинное моноклональное антитело, обозначенное 5H1.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Содержание всех процитированных ссылок, включающих в себя научные статьи, газетные доклады, записи GenBank, патенты и патентные заявки, приведенные в настоящей заявке, явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

Фигуры 1А-1С. Перекрестная конкуренция между 5C4 и другими моноклональными антителами к PD-1 HuMab для связывания с PD-1 человека (hPD-1), экспрессированными на клетках CHO. А, Фрагмент Fab 5C4 по существу блокировал связывание самого моноклонального антитела 5C4, а также связывание 2D3 и 7D3; В, фрагмент Fab 5C4 по существу блокировал связывание моноклонального антитела 4H1; С, моноклональное антитело 5C4 по существу блокировало связывание моноклонального антитела 17D8.

Фигуры 2А-2F. Перекрестная конкуренция конъюгированных с FITC человеческих моноклональных антител к hPD-L1 за связывание с PDF-L1 человека (hPD-L1), экспрессированным на клетках CHO. А, Связывание меченого 10H10 частично блокировалось 10A5, 11E6 и 13G4 и значительно блокировалось само по себе; В,

Связывание меченого 3G10 значительно блокировалось каждым из исследуемых антител к PD-L1, за исключением 10H10; C, Связывание меченого 10A5 значительно блокировалось каждым из исследуемых антител к PD-L1, за исключением 10H10; D, Связывание меченого 11E6 значительно блокировалось каждым из исследуемых антител к PD-L1, за исключением 10H10; и E, Связывание меченого 12A4 значительно блокировалось каждым из исследуемых антител к PD-L1, за исключением 10H10; и F, Связывание меченого 13G4 значительно блокировалось каждым из исследуемых антител к PD-L1, за исключением 10H10.

Фигура 3. Перекрестное конкурентное ингибирование связывания биотинилированного моноклонального антитела 12A4 с клетками ES-2 моноклональными антителами к HPD-L1 человека. Флуоресценция связанного биотин-12A4 представлена в зависимости от концентрации немеченых HuMab hPD-L1.

Фигура 4. Спайдер-диаграмма, показывающая активность моноклонального антитела к PD-1 у пациентов с устойчивой к лечению меланомой (MEL). Репрезентативный график изменений в опухолевой нагрузке с течением времени демонстрирует временной ход изменения в сумме длинных диаметров повреждений-мишеней, по сравнению с исходным уровнем, у 27 пациентов с MEL, подвергавшихся воздействию 5C4 в дозе 1,0 мг/кг. У большинства пациентов, которые достигали объективной реакции (OR), реакции были прочные и очевидны к концу цикла 3 (6 месяцев) лечения (вертикальная пунктирная линия). Опухолевые регрессии после обычных, а также "связанных с иммунной системой" паттернов ответов, такие, как длительное снижение опухолевой нагрузки в присутствии новых очагов.

Фигура 5. Активность моноклонального антитела к PD-1 у пациента с метастатическим RCC. Показана частичная регрессия метастатического RCC у 57-летнего пациента, получавшего 5C4 в дозе 1 мг/кг. Этот пациент ранее подвергался радикальной операции и характеризовался наличием прогрессирующего заболевания после получения сунитиниба, темсиролимуса, сорафениба и пазопаниба. Стрелки показывают регрессию рецидивной опухоли в операционном поле.

Фигуры 6. Активность моноклонального антитела к PD-1 у пациента с метастатическим MEL. Полный ответ метастатического MEL показан у 62-летнего пациента, получавшего 5C4 в дозе 3 мг/кг, связанного с витилиго. (i) Предварительная компьютерная томография, метастазы паховых лимфатических узлов (стрелка); (ii) после 13 месяцев лечения. Многочисленные метастазы в подкожную ткань и

забрюшинное пространство полностью регрессировали (не показано). Витилиго развился после 6 месяцев лечения; фотографии сделаны через 9 месяцев при видимом свете (iii) и ультрафиолетовом свете (iv). Кожные биопсии с иммуногистохимией для ассоциированного с микрофтальмией фактора транскрипции (MITF) показывают меланоциты (стрелки) на эпидермально-дермальном соединении в нормальной коже (v), и небольшое количество (vi) или отсутствие (vii) меланоцитов в коже, частично или полностью зависимое от витилиго.

Фигура 7. Активность моноклонального антитела к PD-1 у пациента с метастатическим NSCLC. Частичный ответ показан у пациента с метастатическим NSCLC (неплоскоклеточная гистология), получавшего 5C4 в дозе 10 мг/кг. Стрелки показывают первоначальное прогрессирование в легочных поражениях с последующей регрессией ("связанный с иммунной системой" паттерн ответа).

Фигуры 8А и 8В. Корреляция между опухолевой экспрессией PD-L1 и анти-PD-1 клинической реакцией. Экспрессия на поверхности опухолевых клеток PD-L1 до воздействия, как определено с помощью ИНС на фиксированных в формалине залитых в парафин образцах, коррелирует с OR к блокаде PD-1. Исследовали сорок два субъекта на поздних стадиях злокачественных опухолей, включающих в себя меланому, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, почечно-клеточного рак и кастрационно-резистентный рак предстательной железы (N = 18, 10, 7, 5 и 2, соответственно). **А,** Наблюдалась значимая корреляция экспрессии PD-L1 на поверхности опухолевых клеток с объективной клинической реакцией. Ни один из пациентов с PD-L1-отрицательными опухолями не испытал OR. **В,** Примеры анализа ИНС с моноклональным антителом к PD-L1 5H1 показаны в метастазах в лимфатических узлах меланомы (вверху), образце нефрэктомии почечно-клеточного рака (в центре) и метастазах головного мозга аденокарциномы легкого (внизу). Все при 400X оригинальном увеличении. Стрелки указывают на одну из многих опухолевых клеток в каждом образце с окрашиванием поверхностной мембраны для PD-L1. Звездочка обозначает обычный клубочек в образце нефрэктомии, который отрицательный для окрашивания PD-L1.

Фигура 9. Графическое сравнение связывания моноклональных антител 28-8 и 5H1 с антигеном PD-L1 в опухолевых тканях с помощью анализа гистологического счета histoscore. Кроличье моноклональное антитело 28-8 показало более высокие показатели, полученные способом гистологического счета в 7 из 10 испытанных образцов.

Фигуры 10A-10D. Спайдер-диаграмма, показывающая активность моноклонального антитела к PD-L1 у пациентов с устойчивыми к лечению MEL и NSCLC. Репрезентативные графики показывают временной ход опухолевой нагрузки поражения-мишени с течением времени у пациентов с MEL, получавших BMS-936559 в дозах 1 (A), 3 (B), 10 мг/кг (C), и у пациентов с NSCLC, получавших дозу 10 мг/кг (D). У большинства пациентов, достигших OR, реакции были прочные и очевидные в конце цикла 2 (3 месяца) лечения, независимо от дозы или типа опухоли. Опухолевые регрессии после обычных, а также "связанных с иммунной системой" паттернов ответов.

Фигура 11. Полный ответ у пациента с меланомой, получавшего BMS-936559 в дозе 3 мг/кг. Круги указывают на первоначальное увеличение размера легочных узелков в 6 недель и 3 месяца с последующей полной регрессией в 10 месяцев ("связанного с иммунной системой" паттерн ответа).

Фигура 12. Полный ответ у пациента с меланомой, получавшего BMS-936559 в дозе 1 мг/кг. Этот пациент развивал выделенные метастазы в головной мозг через 3 месяца после начала лечения, что было успешно излечено при помощи стереотаксической радиохирургии. Частичный ответ при заболевании органов брюшной полости (в кружке) был отмечено в 8 месяцев, без признаков заболевания в 15 месяцев.

Фигура 13. Частичный ответ у пациента с NSCLC (неплоскоклеточная гистология), получавшего BMS-936559 в дозе 10 мг/кг. Обратите внимание на ответ при заболевании в правой легочной плевре и печени.

Фигуры 14A и 14B. Клиническая активность пациентов с MEL, получавших в одновременном режиме лечения ниволумаб и ипилимуаб. A, Репрезентативные спайдер-диаграммы показывают изменения, по сравнению с исходным уровнем в опухолевой нагрузке, определяемой как сумма произведений перпендикулярных диаметров всех поражений-мишеней у пациентов, которые получали в одновременной схеме лечения 1 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимуаб, MTD. Треугольники указывают на первое возникновение нового поражения. B, Репрезентативная каскадная диаграмма показывает максимальный процентный отклик в базовых поражениях-мишенях у пациентов, которые получали одновременную схему лечения.

Фигура 15. Опухолевые регрессии у 52-летнего пациента с MEL, который получал одновременную схему лечения 1 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимуаб. Этот пациент проявлял обширную лимфаденопатию шеи, средостения, подмышечную, брюшной полости и малого таза, двусторонние легочные узелки, небольшие

метастазы кишечника, перитонеальные имплантаты и диффузные подкожные узелки. Исходная лактатдегидрогеназа (ЛДГ) составляла 2,25х верхнюю границу нормы, гемоглобин составлял 9,7 г/дл, и симптомы включали в себя тошноту и рвоту. В течение 4 недель лечения ЛДГ нормализовалась, симптомы улучшились (аппетит увеличился, тошнота уменьшилась) и поражения кожи регрессировали. Сканирования на 12 неделю показало заметное снижение во всех областях заболевания. Стрелками показано расположение метастазов.

Фигуры 16А-16С. Клиническая активность пациентов с MEL, которые получали различные одновременные схемы лечения ниволумаба и ипилимумаба. Репрезентативные спайдер-диаграммы показывают изменения, по сравнению с исходным уровнем в опухолевой нагрузке, определяемой как сумма произведений перпендикулярных диаметров всех поражений-мишеней у пациентов, которые получали одновременную схему лечения 0,3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб (А), 3 мг/кг ниволумаб + 1 мг/кг ипилимумаб (В) или 3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб (С). Треугольники указывают на первое появление нового поражения.

Фигура 17. Опухолевые регрессии у 61-летнего пациента с MEL, который получал одновременную схему лечения 0,3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб. Пациент со стадией IV (M1c) MEL с неизвестным первичным сайтом, с метастазами в желудок и брыжейку. Лактатдегидрогеназа составляла 225 и гемоглобин составлял 9,6 г/дл после недавнего переливания. Через двенадцать недель после начала исследуемого лечения КТ показала 86% снижение в нагрузке с массивным поражением.

Фигуры 18А-18С. Клиническая активность пациентов с MEL, которые получали последовательную схему лечения ниволумаба и ипилимумаба. Репрезентативные спайдер-диаграммы показывают изменения, по сравнению с исходным уровнем опухолевой нагрузки, определяемой как сумма произведений перпендикулярных диаметров всех поражений-мишеней у больных, которые получали последовательную схему лечения 1 мг/кг ниволумаб (А) или 3 мг/кг ниволумаб (В) после предварительной терапии с ипилимумабом. Треугольники указывают на первое возникновение нового поражения. С, репрезентативная каскадная диаграмма показывает на максимальный процентный отклик в базовых уровнях поражений-мишеней у пациентов, которые получали последовательную схему лечения; "*" обозначает пациентов, которые характеризовались рентгенологическим прогрессированием после предварительного лечения ипилимумабом.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам иммунотерапии субъекта, страдающего от таких заболеваний, как злокачественная опухоль или инфекционное заболевание, причем способы включают введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения или средства, которое усиливает эндогенный иммунный ответ, либо стимулируя активацию эндогенной реакции, либо ингибируя супрессию эндогенного ответа. Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрены способы для потенцирования эндогенного иммунного ответа у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, с тем чтобы, таким образом, лечить пациента, способ, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, такого как антитело или его антигенсвязывающий участок, что нарушает или ингибирует передачу сигнала от ингибиторного иммунорегулятора. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторный иммунорегулятор представляет собой компонент сигнального пути PD-1/PD-L1. Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают способы иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, способы, которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего участка, что нарушает взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандом, PD-L1. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок специфически связывается с PD-1. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок специфически связывается с PD-L1. Некоторые варианты осуществления включают использование антитела к PD-1 в комбинации с другим противораковым средством, предпочтительно антителом к CTLA-4, для лечения злокачественной опухоли. Согласно некоторым другим вариантам осуществления субъекта выбирают в качестве подходящего для иммунотерапии в способе, включающем измерение поверхностной экспрессии PD-L1 в исследуемом образце ткани, полученном от пациента со злокачественной опухолью ткани, например, определение доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, и выбор пациента для иммунотерапии, основанный на оценке того, что PD-L1 экспрессируется на клеточной поверхности в исследуемом образце ткани.

Термины

Для того, чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, сначала определяются некоторые термины. Как используется в настоящей заявке, за исключением случаев, прямо предусмотренных в настоящем документе, каждый из следующих терминов характеризуется изложенным ниже смыслом. Дополнительные определения приведены на протяжении всей заявке.

"Введение" относится к физическому введению содержащей терапевтическое средство композиции субъекту, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. Предпочтительные способы введения для антител согласно настоящему изобретению включают в себя внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрибрюшинное, спинальное или другие парентеральные способы введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению может быть введено непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или путь введения через слизистую, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов времени.

Используемое в настоящем документе "нежелательное явление" (АЕ) представляет собой любой неблагоприятный и в целом непреднамеренный или нежелательный знак (включающий в себя аномальные лабораторные данные), симптом или заболевание, связанное с использованием медицинской помощи. Например, нежелательное явление может быть связано с активацией иммунной системы или расширением клеток иммунной системы (например, Т-клеток) в ответ на лечение. Лечение может характеризоваться одним или несколькими связанными с ним АЕ, и каждый АЕ может характеризоваться таким же или другим уровнем тяжести. Ссылка на способы, позволяющие "изменение нежелательных явлений" означает схему лечения, которая

снижает распространенность и/или тяжесть одного или нескольких АЕ, связанных с использованием другой схемы лечения.

"Антитело" (Ab) включает в себя без ограничения гликопротеиновый иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном и содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающий участок. Каждая H-цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе как V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно в настоящем документе как V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один константный домен, C_L . Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые представляют собой более консервативные, называемые каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитела, как правило, специфически связываются со своим родственным антигеном с высокой аффинностью, отраженной в константе диссоциации (K_D) от 10^{-5} до 10^{-11} M^{-1} или меньше. Любая K_D больше чем приблизительно 10^{-4} M^{-1} , как правило, рассматривается как указывающая на неспецифическое связывание. Как используется в настоящем документе, антитело, которое "специфически связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и, по существу, идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает наличие K_D , равной 10^{-7} M или менее, предпочтительно 10^{-8} M или менее, еще более предпочтительно от 5×10^{-9} M или менее, и наиболее предпочтительно от 10^{-8} M и 10^{-10} M или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген представляет собой "по существу идентичное" данному антигену, если он проявляет высокую степень идентичности последовательности к данному антигену, например,

если он проявляет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, или даже более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности последовательности по отношению к последовательности данного антигена. В качестве примера, антитело, которое специфически связывается с PD-1 человека, может также характеризоваться перекрестной реактивностью с антигенами PD-1 от некоторых приматов, но может перекрестно не реагировать с антигенами PD-1 от некоторых видов грызунов или с антигеном, отличным от PD-1, например, антигеном PD-L1 человека.

Иммуноглобулин может происходить от любого из общеизвестных изотипов, включающих в себя без ограничения IgA, секреторные IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в настоящей области техники и включают в себя без ограничения человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. "Изотип" относится к классу или подклассу антитела (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Термин "антитело" включает в себя, в качестве примера, как природные, так и неприродные антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие или нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела. Нечеловеческое антитело может быть гуманизированным с помощью рекомбинантных способов для уменьшения его иммуногенности у человека. Там, где явно не указано иное и если из контекста не следует иное, термин "антитело" также включает в себя антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий участок любого из указанных выше иммуноглобулинов, и включает в себя одновалентный и двухвалентный фрагмент или участок одноцепочечного антитела.

"Выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит другие антитела, характеризующиеся различными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1 представляет собой по существу свободное от антител, которые специфически связываются с другими антигенами, отличными от PD-1). Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью к другим антигенам, таким как молекулы PD-1 от различных видов. Кроме того, выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ. Для сравнения, "выделенная" нуклеиновая кислота относится к композиции нуклеиновой кислоты вещества, которое заметно отличается, т.е. характеризуется отличительной

химической идентичностью, природой и полезностью, от нуклеиновых кислот, как они существуют в природе. Например, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, представляет собой свободно стоящую часть в нативной ДНК, а не неотъемлемую часть более крупного структурного комплекса, хромосомы, встречающейся в природе. Кроме того, выделенная ДНК, в отличие от нативной геномной ДНК, как правило, может быть использована в приложениях или способах, для которых нативная геномная ДНК не подходит, например, в качестве праймера ПЦР или гибридизационного зонда для, в частности, измерения экспрессии генов и обнаружения генов биомаркеров или мутаций для диагностики заболевания или оценки эффективности лекарственного средства. Выделенная нуклеиновая кислота может быть очищена так, чтобы быть по существу свободной от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с использованием стандартных техник, хорошо известных в настоящей области техники. Примеры отдельных нуклеиновых кислот включают в себя фрагменты геномной ДНК, амплифицированной с помощью ПЦР ДНК, кДНК и РНК.

Термин "моноклональное антитело" ("mAb") относится к препарату молекул антител одной молекулярной композиции, т.е. молекулам антител, чьи первичные последовательности по существу идентичны, и которые проявляют единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Моноклональное антитело представляет собой пример выделенного антитела. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, рекомбинантной трансгенной или других техник, известных специалистам в настоящей области техники.

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, содержащему вариабельные области, в которых обе каркасные области и области CDR выделены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константную область также получают из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулина человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако, используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не предназначен для включения в себя антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были привиты на

последовательности каркасных областей человека. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются как синонимы.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR отличного от человеческого антитела замещены соответствующими аминокислотами, полученных из человеческих иммуноглобулинов. Согласно одному варианту осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR были замещены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областей CDR представляют собой неизменные. Небольшие добавки, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот представляют собой допустимые до тех пор, пока они не отменяют способность антитела связываться с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную исходному антителу.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области получают от одного вида и константные области получают от другого вида, такому как антитело, в котором переменные области получают от мышиного антитела и константные области получают от человеческого антитела.

"Антигенсвязывающий участок" антитела (также называемый "антигенсвязывающий фрагмент") относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным всем антителом.

"Злокачественная опухоль" относится широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое клеточное деление и рост приводит к образованию злокачественных опухолей, которые вторгаются в соседние ткани, а также могут метастазировать в отдаленные части организма через лимфатическую систему или кровь.

"Иммунный ответ" относится к действию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, клеток натуральных киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, полученных с помощью любой из этих клеток или печенью (включая в себя антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному нацеленному воздействию, связыванию, повреждению, уничтожению и/или выведению из организма позвоночных вторгающихся патогенных микроорганизмов, клеток или

тканей, инфицированных возбудителями, злокачественными или другими патологическими клетками, или, в случае аутоиммунных заболеваний или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

"Иммунорегулятор" относится к веществу, средству, сигнальному пути или его компоненту, который регулирует иммунный ответ. "Регулирование", "модифицирование" или "модуляция" иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или в активности такой клетки. Такое регулирование включает в себя стимуляцию или супрессию иммунной системы, которая может проявляться увеличением или уменьшением числа различных клеточных типов, увеличением или уменьшением в активности этих клеток или любых других изменений, которые могут произойти в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммунорегуляторы, некоторые из которых, возможно, характеризуются усовершенствованной функцией в микросреде злокачественной опухоли.

Термин "иммунотерапия" относится к лечению субъекта, страдающего от или характеризующегося риском заражения или испытания повторения заболевания с помощью способа, включающего индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунного ответа. "Лечение" или "терапия" субъекта относится к любому типу вмешательства или процесса, выполняемому на, или введения активного средства субъекту с целью обращения вспять, облегчения, улучшения, препятствия, замедления или предотвращения возникновения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимического показателя, связанного с заболеванием.

"Потенцирование эндогенного иммунного ответа" означает повышение эффективности или активности существующего иммунного ответа у субъекта. Это увеличение эффективности и активности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые супрессируют эндогенный иммунный ответ хозяина или с помощью стимулирующих механизмов, которые повышают эндогенный иммунного ответа хозяина.

"Заданное пороговое значение", относящееся к экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности, относится к доле клеток в исследуемом образце ткани, содержащем опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, выше которого образец набирает как положительный на экспрессию PD-L1 на клеточной поверхности. Экспрессию на клеточной поверхности анализировали с помощью ИНС с

моноклональным антителом 28-8, заданное пороговое значение для клеток, экспрессирующих PD-L1 на клеточной поверхности в диапазоне по меньшей мере от приблизительно 0,01% до по меньшей мере приблизительно 20% от общего числа клеток. Согласно предпочтительным вариантам осуществления заданное пороговое значение для клеток, экспрессирующих PD-L1 на клеточной поверхности, варьирует в диапазоне по меньшей мере от приблизительно 0,1% до по меньшей мере приблизительно 10% от общего числа клеток. Более предпочтительно, заданное пороговое значение составляет по меньшей мере приблизительно 5%. Еще более предпочтительно, заданное пороговое значение составляет по меньшей мере приблизительно 1% или находится в интервале 1-5%.

Рецептор "Programmed Death-1 (PD-1)" относится к иммуноингибиторному рецептору, принадлежащему к семейству CD28. PD-1 экспрессируется преимущественно на предварительно активированных Т-клетках *in vivo*, и связывается с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2. Используемый в настоящем документе термин "PD-1" включает в себя PD-1 человека (hPD-1), варианты, изоформы и гомологи видов HPD-1, и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-1. Полную последовательность hPD-1 можно найти в GenBank, номер доступа U64863.

"Programmed Death Ligand-1 (PD-L1)" представляет собой один из двух клеточных поверхностных гликопротеиновых лигандов для PD-1 (другой PD-L2), который подавляет активацию Т-клеток и секрецию цитокинов после связывания с PD-1. Используемый в настоящем документе термин "PD-L1" включает в себя PD-L1 человека (hPD-L1), варианты, изоформы и гомологи видов HPD-L1, и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1. Полную последовательность hPD-1 можно найти в GenBank, номер доступа Q9NZQ7.

"Путь переноса сигнала" или "сигнальный путь" относится к биохимической связи между различными молекулами-переносчиками сигнала, которые играют важную роль в передаче сигнала от одной части клетки в другую часть клетки. "Рецептор клеточной поверхности" включает в себя, например, молекулы и комплексы молекул, которые расположены на поверхности клетки и которые способны принимать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую мембрану клетки. Пример рецептора клеточной поверхности согласно настоящему изобретению представляет собой рецептор PD-1, который расположен на поверхности активированных Т-клеток, активированных В-клеток и миелоидных клеток, и передает сигнал, который приводит к уменьшению проникающих в опухоль лимфоцитов и уменьшению

пролиферации Т-клеток. "Ингибитор" передачи сигнала относится к соединению или средству, которое действует как антагонист или уменьшает инициацию, прием или передачу сигнала, при этом сигнал представляет собой стимулирующий или ингибирующий под влиянием какого-либо компонента сигнального пути, такого как рецептор или его лиганд.

"Субъект" включает в себя любого человека или отличного от человека животного. Термин "отличное от человека животное" включает в себя без ограничения таких позвоночных, как нечеловекоподобные приматы, овцы, собаки, кошки, кролики и хорьки, таких грызунов, как мыши, крысы и морские свинки, таких птиц, как куры, амфибий и рептилий. Согласно предпочтительным вариантам осуществления субъект представляет собой такое млекопитающее, как нечеловекоподобный примат, овца, собака, кошка, кролик, хорек или грызун. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Термины "субъект", "пациент" и "индивидуум" используются в настоящем документе как взаимозаменяемые.

Термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного или терапевтического средства, такого как антитело согласно настоящему изобретению представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством, защищает субъекта от появления заболевания или способствует регрессии заболевания, подтверждаемой уменьшением выраженности симптомов заболевания, увеличением частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращением нарушений или инвалидностью в связи с заболеванием. Способность терапевтического средства содействовать регрессии заболевания может быть оценена с помощью различных способов, известных специалисту в настоящей области техники, таких как у субъектов-людей в ходе клинических испытаний, в животных модельных системах прогнозирования эффективности у людей или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

В качестве примера, противораковое средство способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. Согласно предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до точки устранения злокачественной опухоли. "Содействие регрессии злокачественной опухоли" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, одного или

в комбинации с противоопухолевым средством, приводит к снижению роста опухоли или размера, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращению нарушений или инвалидности в связи с заболеванием. Кроме того, термины "эффективное" и "эффективность" в отношении лечения включают в себя как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства содействовать регрессии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном, органном и/или организменном уровне (нежелательные явления) в результате приема лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей, терапевтически эффективное количество лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% по отношению к субъектам без воздействия. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения регрессию опухоли можно наблюдать и продолжать в течение по меньшей мере приблизительно 20 дней, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 дней или даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 дней. Несмотря на эти конечные измерения терапевтической эффективности, оценка иммунотерапевтических лекарственных средств должна тоже вносить поправку в "связанные с иммунной системой" паттерны ответов.

"Связанный с иммунной системой" паттерн ответа относится к клинической картине ответа, часто наблюдаемой у онкологических пациентов, подвергаемых лечению иммунотерапевтическими средствами, которые производят противоопухолевое действие, индуцируя специфические к злокачественной опухоли иммунные реакции или модифицируя нативные иммунные процессы. Эта картина ответа характеризуется полезным терапевтическим эффектом, который следует после первоначального увеличения опухолевой нагрузки или появления новых поражений, которые в оценке традиционных химиотерапевтических средств могут быть классифицированы как прогрессирование заболевания и будут синонимом отказа от лекарственных средств.

Соответственно, правильная оценки иммунотерапевтических средств может потребовать долгосрочного мониторинга эффектов этих средств в отношении нацеленного воздействия на заболевание.

Терапевтически эффективное количество лекарственного средства включает в себя "профилактически эффективное количество", которое представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при введении по отдельности или в комбинации с противоопухолевым средством субъекту с риском развития злокачественной опухоли (например, субъекту, характеризующемуся предварительным злокачественным состоянием) или страдающему рецидивом злокачественной опухоли, ингибирует развитие или рецидив злокачественной опухоли. Согласно предпочтительным вариантам осуществления профилактически эффективное количество предотвращает развитие или рецидив злокачественной опухоли полностью. "Ингибирование" развития или рецидива злокачественной опухоли означает либо уменьшение вероятности развития злокачественной опухоли или рецидива, или предотвращение развития или рецидива злокачественной опухоли полностью.

"Проникающие в опухоль воспалительные клетки" представляет собой любой тип клеток, которые, как правило, принимают участие в воспалительной реакции у субъекта и которые проникают в опухолевую ткань. Такие клетки включают в себя проникающие в опухоль лимфоциты (TIL), макрофаги, моноциты, эозинофилы, гистиоциты и дендритные клетки.

Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как означающее либо один, два, либо любую их комбинацию из альтернатив. Используемые в настоящем документе неопределенные артикли следует понимать как ссылку на "один или несколько" любого указанного или пронумерованного компонента.

Термины "приблизительно" или "содержащий по существу" относится к значению или композиции, которая находится в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения или композиции, как определено любым специалистом в настоящей области техники, который будет зависеть отчасти от того, как значение или композиция измеряется или определяется, т.е. ограничений системы измерения. Например, "приблизительно" или "содержащий по существу" может означать в 1 или более 1 стандартном отклонении в практике в настоящей области техники. Кроме того, "приблизительно" или "содержащий по существу" может означать диапазон до 20%. Кроме того, в частности, по отношению к биологическим системам и процессам,

термины могут означать вплоть до порядка величины или до 5-кратного значения. Когда конкретные значения или композиции предусмотрены в приложении и в формуле изобретения, если не указано иное, значение "приблизительно" или "содержащий по существу" следует считать в пределах приемлемого диапазона ошибок для данного значения или композиции.

Как описано в настоящем документе, должно быть понятно, что любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон отношений или диапазон целого числа включает в себя значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, их фракции (например, одной десятой и одной сотой целого числа), если не указано иное.

Различные аспекты настоящего изобретения будут описаны более подробно в следующих подразделах.

Антитела согласно настоящему изобретению

Антитела согласно настоящему изобретению включают в себя различные антитела, характеризующиеся описанными в настоящем документе структурными и функциональными свойствами, включающими в себя высокую аффинность связывания с PD-1 или PD-L1, соответственно. Эти антитела могут быть использованы, например, в качестве терапевтических антител для лечения пациентов, страдающих от заболевания или в качестве реагентов в диагностических анализах для обнаружения их родственных антигенов. Человеческие моноклональные антитела (HuMAb), которые специфически связываются с PD-1 (например, связываются с PD-1 человека и, возможно, перекрестно реагируют с PD-1 от других видов, таких как макаки) с высокой аффинностью были раскрыты в патенте США № 8008449, и HuMAb, которые специфически связываются с PD-L1 с высокой аффинностью были раскрыты в патенте США № 7943743. Антитела согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения все антитела к PD-1 и к PD-L1, раскрытые в патенте США № 8008449 и 7943743, соответственно. Другие моноклональные антитела к PD-1 были описаны, например, в патентах США № 6808710, 7488802 и 8168757, а также публикации согласно PCT № WO 2012/145493, и моноклональные антитела к PD-L1 были описаны, например, в патентах США № 7635757 и 8217149, публикации США № 2009/0317368 и публикации согласно PCT № WO 2011/066389 и WO 2012/145493. В случаях, когда эти моноклональные антитела к PD-1 и к PD-L1 демонстрируют структурные и функциональные свойства, описанные в настоящем документе для

антител согласно настоящему изобретению, они также включаются в качестве антител согласно настоящему изобретению.

Антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению

Было показано, что каждый из человеческих моноклональных антител к PD-1, описанных в патенте США № 8008449, обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (a) связывается с PD-1 человека с K_D , составляющей 1×10^{-7} М или менее, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы биосенсора Biacore; (b) по существу, не связывается с CD28, CTLA-4 или ICOS человека; (c) увеличивает пролиферацию Т-клеток в анализе смешанной реакции лимфоцитов (MLR); (d) увеличивает производство интерферона γ в анализе MLR; (e) увеличивает секрецию ИЛ-2 в анализе MLR; (f) связывается с PD-1 человека и PD-1 макака; (g) ингибирует связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1; (h) стимулирует антигенспецифические реакции памяти; (i) стимулирует ответы антител и (j) ингибирует рост опухолевых клеток *in vivo*. Антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению включают в себя моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и обладают по меньшей мере одной, предпочтительно по меньшей мере пятью из предыдущих характеристик.

В патенте США № 8008449 представлены семь человеческих моноклональных антител к PD-1: 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (также называемое в настоящем документе как ниволумаб или BMS-936558), 4A11, 7D3 и 5F4. Выделенные молекулы ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепи этих антител были секвенированы, из которого были выведены аминокислотные последовательности переменных областей. Аминокислотные последовательности V_H 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4 приведены в настоящем документе как SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, соответственно. Аминокислотные последовательности V_L 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4 приведены в настоящем документе как SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14, соответственно.

Предпочтительные антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению включают в себя человеческие моноклональные антитела к PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4. Эти предпочтительные антитела специфически связываются с PD-1 человека и содержат: (a) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты,

характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8; (b) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9; (c) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10; (d) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11; (e) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12; (f) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13; или (g) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с PD-1, последовательности V_H и V_L могут быть "смешаны и подобраны", чтобы создать другие антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению. Связывание PD-1 таких "смешанных и подобранных" антител может быть проверено с использованием анализов связывания, например, иммуноферментного анализа (ELISA), вестерн-блоттинга,

радиоиммуноанализа и анализа Biacore, который хорошо известен в настоящей области техники (смотрите, например, патент США № 8008449). Предпочтительно, когда цепи V_H и V_L смешиваются и подбираются, последовательность V_H от конкретного спаривания V_H/V_L заменяется структурно подобной последовательностью V_H . Кроме того, предпочтительно, последовательность V_L от конкретного спаривания V_H/V_L заменяется структурно подобной последовательностью V_L . Соответственно, антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению включают в себя выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок в этом, содержащий: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14, причем антитело специфически связывается с PD-1, предпочтительно PD-1 человека.

Домены CDR указанных антител были очерчены с использованием системы Kabat, и эти антитела также могут быть определены с помощью комбинаций их 3 CDR тяжелых цепей и 3 CDR легких цепей (смотрите патент США № 8008449). Поскольку каждое из этих антител может связываться с PD-1, и обеспечивается антигенсвязывающая специфичность, прежде всего, областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности CDR1, CDR2, CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2, CDR3 V_L могут быть "смешаны и подобраны" (т.е., CDR из разных антител можно смешивать и сочетать, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, CDR2, CDR3 V_H и CDR1, CDR2, CDR3 V_L), чтобы создать другие антитела к PD-1, которые также представляют собой антитела согласно настоящему изобретению. Связывание PD-1 таких "смешанных и подобранных" антител может быть исследовано с использованием анализов связывания, описанных выше (например, ELISA, вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализа и анализа Biacore).

Антитела согласно настоящему изобретению также включают в себя выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-1 и содержат вариабельную область тяжелой цепи, полученную из конкретной тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии и/или вариабельную область легкой цепи, полученной из конкретной легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии. В частности, согласно некоторым вариантам осуществления антитела настоящего изобретения включают в себя выделенные антитела, содержащие: (а) вариабельную область

тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-33 или 4-39 V_H зародышевой линии человека, и/или вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 или L15 V_K зародышевой линии человека. Аминокислотные последовательности областей V_H и V_K , кодируемые генами 3-33 V_H , 4-39 V_H , L6 V_K и L15 V_K зародышевой линии, представлены в патенте США № 8008449.

Используемое в настоящем документе антитело может быть идентифицировано как содержащее вариабельную область тяжелой или легкой цепи, которая "происходит от" конкретного иммуноглобулина зародышевой линии человека путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями, кодируемыми генами иммуноглобулина зародышевой линии человека, и выбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которая находится ближе всего по последовательности (т.е. самый большой процент идентичности последовательности) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "происходит от" конкретного иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии из-за, например, природных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Тем не менее, выбранное антитело человека по аминокислотной последовательности, как правило, по меньшей мере на 90% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют человеческое антитело как человеческое, по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В некоторых случаях, человеческое антитело может быть по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность человеческого антитела, полученная из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет отображать не более 10 аминокислотных различий от

аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно другим вариантам осуществления человеческое антитело может отображать не более 5 или даже не более чем 4, 3, 2 или 1 аминокислотное различие от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению также включают в себя выделенные антитела или их антигенсвязывающие участки, содержащие: (a) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-33 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 V_K зародышевой линии человека; или (b) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 4-39 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L15 V_K зародышевой линии человека. Примеры антител, содержащих V_H и V_K , полученные из последовательностей 3-33 V_H и L6 V_K зародышевой линии, соответственно, включают в себя 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 и 7D3. Примеры антитела, содержащих области V_H и V_K , полученные из последовательностей 4-39 V_H и L15 V_K зародышевой линии, соответственно, включают в себя 4A11 и 5F4.

Согласно еще другим вариантам осуществления антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые очень похожи или гомологичны аминокислотным последовательностям предпочтительных антител к PD-1, описанных в настоящем документе, причем антитело сохраняет функциональные свойства предпочтительных антител к PD-1 согласно настоящему изобретению. Например, антитела согласно настоящему изобретению включают в себя моноклональные антитела, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, а вариабельная область легкой цепи содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14. Согласно другим вариантам осуществления аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут проявлять по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению к представленным выше последовательностям.

Используемый в настоящем документе процент идентичности последовательности (также упоминаемый как процент гомологии последовательности) между двумя последовательностями (аминокислотными или нуклеотидными последовательностями) представляет собой функцию числа идентичных положений, общих для последовательностей по отношению к длине сравниваемых последовательностей (т.е., % идентичности = число идентичных положений/общее число сравниваемых положений $\times$ 100), принимая во внимание количество любых пробелов и длину каждого такого пробела, введенных для максимизирования степени идентичности последовательности между двумя последовательностями. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено с использованием математических алгоритмов, которые хорошо известны специалистам с обычной квалификацией в настоящей области техники (смотрите, например, патент США № 8008449).

Антитела, характеризующиеся очень сходными аминокислотными последовательностями, вероятно, характеризуются по существу теми же функциональными свойствами, где различия последовательностей представляют собой консервативные модификации. Используемые в настоящем документе "консервативные модификации последовательностей" относятся к аминокислотным модификациям, которые существенно не влияют на связывающие характеристики антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают в себя аминокислотные замены, добавления и делеции. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком, характеризующимся сходной боковой цепью. Так, например, один или несколько аминокислотных остатков в областях CDR антитела согласно настоящему изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей,

и измененное антитело может быть исследовано на сохраняемую функцию с использованием функциональных анализов, которые хорошо известны в настоящей области техники. Соответственно, некоторые варианты осуществлений антител к PD-1 согласно настоящему изобретению содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, каждая из которых содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3, причем одна или несколько из этих областей CDR содержит последовательно связанные аминокислоты, содержащие последовательности, которые представляют собой такие же, как последовательности CDR описанных в настоящем документе предпочтительных антител к PD-1 (например, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 или 5F4) или их консервативных модификаций, и причем антитела сохраняют желательные функциональные свойства предпочтительных антител к PD-1 согласно настоящему изобретению.

Кроме того, хорошо известно в настоящей области техники, что CDR3 тяжелой цепи представляет собой первичную детерминанту, определяющую специфичность и аффинность связывания антитела, и что множественные антитела предсказуемо могут быть получены с теми же связывающими характеристиками на основе общей последовательности CDR3 (смотрите, например, Klimka *et al.*, 2000; Beiboer *et al.*, 2000; Rader *et al.*, 1998; Barbas *et al.*, 1994; Barbas *et al.*, 1995; Ditzel *et al.*, 1996; Berezov *et al.*, 2001; Igarashi *et al.*, 1995; Bourgeois *et al.*, 1998; Levi *et al.*, 1993; Polymenis and Stoller, 1994 и Xu and Davis, 2000). Предшествующие публикации показывают, что, в общем, как только определяется последовательность CDR3 тяжелой цепи данного антитела, изменчивость в других пяти последовательностях CDR не сильно влияет на специфичность связывания этого антитела. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению, содержащие 6 CDR, могут быть определены путем указания последовательности домена CDR3 тяжелой цепи.

Антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению также включают в себя выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека с любым из человеческих моноклональных антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4. Таким образом, антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению включают в себя выделенные антитела или их антигенсвязывающие участки, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 с эталонным антителом или с эталонным его антигенсвязывающим участком, содержащим: (а) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся

последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8; (b) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9; (c) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10; (d) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11; (e) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12; (f) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13; или (g) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14.

Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти антитела связываются с той же областью эпитопа (т.е., тем же или перекрывающимся или смежным эпитопом) антигена и стерически препятствуют

связыванию других перекрестно конкурирующих антител с этой определенной областью эпитопа. Таким образом, способность исследуемого антитела конкурентно ингибировать связывание, например, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 или 5F4, с PD-1 человека демонстрирует, что исследуемое антитело связывается с той же областью эпитопа PD-1 человека, что и 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 или 5F4, соответственно. Все выделенные антитела, которые связываются с той же областью эпитопа PD-1 человека, что и человеческое моноклональное антитело 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 или 5F4, относятся к числу антител согласно настоящему изобретению. Эти перекрестно конкурирующие антитела, как ожидается, будут характеризоваться очень схожими функциональными свойствами в силу их связывания с той же областью эпитопа PD-1. Например, перекрестно конкурирующие моноклональные антитела к PD-1 5C4, 2D3, 7D3, 4H1 и 17D8, как было показано, характеризуются аналогичными функциональными свойствами (смотрите патент США № 8008449 на примерах 3-7). Чем выше степень перекрестной конкуренции, тем более схожими будут функциональные свойства. Кроме того, перекрестно конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы на основе их способности перекрестно конкурировать с 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 или 5F4 в стандартных анализах связывания PD-1. Например, анализ Вiascore, ELISA или проточная цитометрия могут быть использованы для демонстрации перекрестной конкуренции с антителами согласно настоящему изобретению (смотрите, например, примеры 1 и 2).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека или связываются с той же областью эпитопа PD-1 человека, как 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 или 5F4, представляют собой моноклональные антитела. Для введения пациентам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой предпочтительно химерные антитела или более предпочтительно гуманизированные или человеческие антитела. Такие человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены, как описано в патенте США № 8008449. Данные, представленные в примере 1, показывают, что 5C4 или Fab-фрагмент перекрестно конкурирует с каждым из 2D3, 7D3, 4H1 или 17D8 за связывание с hPD-1, экспрессированным на поверхности клетки, указывая на то, что все пять моноклональных антител к PD-1 связываются с той же областью эпитопа hPD-1 (фиг. 1A-1C).

Антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению дополнительно может быть получено с использованием антитела, содержащего одну или несколько раскрытых в настоящем документе последовательностей V_H и/или V_L в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может характеризоваться измененными свойствами по отношению к начальному антителу. Антитело может быть сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в одной или нескольких переменных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в пределах одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или альтернативно, антитело может быть сконструировано путем модификации остатков в константной области(ях), например, чтобы изменить эффекторную функцию(и) антитела. Специфические модификации в антителах включают в себя прививку CDR, сайтспецифическую мутацию аминокислотных остатков в пределах областей CDR1, CDR2 и/или CDR3 V_H и/или V_K , чтобы таким образом улучшить одно или несколько связывающих свойств (например, аффинность) антитела, сайтспецифический мутагенез аминокислотных остатков в пределах каркасных областей V_H и/или V_K , чтобы уменьшить иммуногенность антитела, модификации в пределах области Fc, как правило, чтобы изменить одно или несколько функциональных свойств антитела, такие как время полужизни в сыворотке, фиксацию комплемента, связывание рецептора Fc и/или антигензависимую клеточную цитотоксичность, и химическую модификацию, например, пегилирование или изменение в паттерне гликозилирования, чтобы увеличить или уменьшить биологическое (например, в сыворотке) время полужизни антитела. Специфические примеры таких модификаций и способов конструирования антител подробно описаны в патенте США № 8008449. Антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению включают в себя все такие сконструированные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и получаются путем модификации любого из вышеописанных антител к PD-1.

Антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению также включают в себя антигенсвязывающие фрагменты вышеуказанных антител. Было убедительно показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антигенсвязывающий участок" антитела включают в себя (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных

дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; и (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела.

Эти фрагменты, полученные первоначально с помощью протеолиза с такими ферментами, как папаин и пепсин, впоследствии были сконструированы в моновалентные и поливалентные антигенсвязывающие фрагменты. Например, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов, с помощью синтетического линкерного пептида, что дает им возможность быть выполненными в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H образуют пару для образования одновалентных молекул, известных как одноцепочечные переменные фрагменты (scFv). Двухвалентные или бивалентные scFv (ди-scFv или би-scFv) могут быть сконструированы путем объединения scFv в пределах одной пептидной цепи, известной как тандем scFv, который содержит две области V_H и две V_L . scFv димеры и более высокие мультимеры могут быть также созданы с использованием линкерных пептидов из менее чем 10 аминокислот, которые слишком короткие для того, чтобы две переменные области складывались вместе, что заставляет scFv димеризоваться и производить диателу или образовывать другие мультимеры. Диателу, как было показано, связываются с их родственными антигенами с гораздо более высокой аффинностью, чем соответствующие scFv, характеризующиеся константами диссоциации до 40 раз ниже, чем значения K_D для scFv. Очень короткие линкеры (≤ 3 аминокислот) приводят к образованию трехвалентных триател или четырехвалентных тетрател, которые обладают еще более высокими аффинностями к их антигенам, чем диателу. Другие варианты включают в себя минителу, которые представляют собой димеры scFv- C_{H3} и более крупные фрагменты scFv-Fc (димеры scFv- C_{H2} - C_{H3}), и даже выделенная CDR может проявлять антигенсвязывающую функцию. Эти фрагменты антител конструируют с использованием обычных рекомбинантных техник, известных специалистам в настоящей области техники, и фрагменты подвергают скринингу на полезность таким же образом, как и интактные антитела. Все из выше перечисленных протеолитических и сконструированных фрагментов антител и связанных с ними вариантов (смотрите Hollinger and Hudson, 2005; Olafsen and Wu, 2010, для получения более подробной информации) предназначены для охвата термином "антигенсвязывающий участок" антитела.

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению

Было продемонстрировано, что каждый из человеческих моноклональных антител к PD-L1, раскрытых в патенте США № 7943743, обладает одной или несколькими из следующих характеристик (а) связывается с PD-L1 человека с K_D , равной 1×10^{-7} М или менее; (b) увеличивает пролиферацию Т-клеток в анализе реакции смешанных лимфоцитов (MLR); (c) увеличивает производство интерферона- γ в анализе MLR; (d) увеличивает секрецию IL-2 в анализе MLR; (e) стимулирует реакции антител; (f) ингибирует связывание PD-L1 с PD-1; и (g) меняет супрессивный эффект регуляторных Т-клеток на эффекторные Т-клетки и/или дендритные клетки. Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению включают в себя моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и обладают по меньшей мере одной, предпочтительно по меньшей мере четырьмя из предыдущих характеристик.

В патенте США № 7943743 представлены десять человеческих моноклональных антител к PD-1: 3G10, 12A4 (также упоминаемый в настоящем документе как BMS-936559), 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4. Выделенные молекулы ДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепи этих антител были секвенированы, из которых были выведены аминокислотные последовательности переменных областей. Аминокислотные последовательности V_H 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4 приведены в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, соответственно, в то время как их аминокислотные последовательности V_L показаны в SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34, соответственно.

Предпочтительные антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению включают в себя человеческие моноклональные антитела к PD-L1 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4. Эти предпочтительные антитела специфически связываются с PD-L1 человека и содержат: (a) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25; (b) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты,

тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с PD-L1, последовательности V_H и V_L могут быть "смешаны и подобраны", чтобы создать другие антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Связывание PD-L1 таких "смешанных и подобранных" антител может быть проверено с использованием анализов связывания, например, ELISA, вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализа и анализа Biacore, которые хорошо известны в настоящей области техники (смотрите, например, патент США № 7943743). Предпочтительно, когда цепи V_H и V_L смешиваются и подбираются, последовательность V_H от конкретного спаривания V_H/V_L замещается структурно подобной последовательностью V_H . Кроме того, предпочтительно, последовательность V_L от конкретного спаривания V_H/V_L замещается структурно подобной последовательностью V_L . Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также включают в себя моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34, причем антитело специфически связывается с PD-L1, предпочтительно PD-L1 человека.

Домены CDR указанных антител были очерчены с использованием системы Kabat, и эти антитела также могут быть определены с помощью комбинаций их 3 CDR тяжелых цепей и 3 CDR легких цепей (смотрите патент США № 7943743). Поскольку каждое из этих антител может связываться с PD-L1, и антигенсвязывающая специфичность обеспечивается, прежде всего, областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности CDR1, CDR2, CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2, CDR3 V_L могут быть "смешаны и подобраны" (т.е., CDR из разных антител можно смешивать и сочетать, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, CDR2, CDR3 V_H и CDR1, CDR2, CDR3 V_L), чтобы создать другие антитела к PD-L1, которые также представляют собой антитела согласно настоящему изобретению. Связывание PD-L1

таких "смешанных и подобранных" антител может быть исследовано с использованием анализов связывания, описанных выше (например, ELISA, вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализа и анализа Biacore).

Антитела согласно настоящему изобретению также включают в себя выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 и содержат вариабельную область тяжелой цепи, полученную из конкретной тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии и/или вариабельную область легкой цепи, полученную из конкретной легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии. В частности, согласно некоторым вариантам осуществления антитела настоящего изобретения включают в себя выделенные антитела, содержащие: (а) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-18, 1-69, 1-3 или 3-9 V_H зародышевой линии человека, и/или вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6, L15, A27 или L18 V_K зародышевой линии человека. Аминокислотные последовательности областей V_H и V_K , кодируемые генами 1-18 V_H , 1-3 V_H , 1-69 V_H , 3-9 V_H , L6 V_K , L15 V_K и A27 V_K зародышевой линии, представлены в патенте США № 7943743.

Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению включают в себя выделенные антитела или их антигенсвязывающие участки, содержащие: (а) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-18 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 V_K зародышевой линии человека; (b) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-69 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 V_K зародышевой линии человека; (с) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из

последовательности 1-3 V_H зародышевой линии человека, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L15 V_K зародышевой линии человека; (d) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-69 V_H зародышевой линии человека, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности A27 V_K зародышевой линии человека; (e) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-9 V_H зародышевой линии человека, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L15 V_K зародышевой линии человека; или (f) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-9 V_H зародышевой линии человека, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L18 V_K зародышевой линии человека.

Пример антитела, содержащего V_H и V_K , полученные из последовательностей 1-18 V_H и L6 V_K зародышевой линии, соответственно, представляет собой 3G10. Примеры антител, содержащих области V_H и V_K , полученные из последовательностей 1-69 V_H и L6 V_K зародышевой линии, соответственно, включают в себя 12A4, 1B12, 7H1 и 12B7. Пример антитела, содержащего V_H и V_K , полученные из последовательностей 1-3 V_H и L15 V_K зародышевой линии, соответственно, представляет собой 10A5. Примеры антител, содержащих области V_H и V_K , полученные из последовательностей 1-69 V_H и A27 V_K зародышевой линии, соответственно, включают в себя 5F8, 11E6 и 11E6a. Пример антитела, содержащего V_H и V_K , полученные из последовательностей 3-9 V_H и L15 V_K зародышевой линии, соответственно, представляет собой 10H10. Пример антитела, содержащего V_H и V_K , полученные из последовательностей 1-3 V_H и L15 V_K зародышевой линии, соответственно, представляет собой 10A5. Пример антитела, содержащего V_H и V_K , полученные из последовательностей 3-9 V_H и L18 V_K зародышевой линии, соответственно, представляет собой 13G4.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению содержат переменные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые очень похожи или гомологичны аминокислотным последовательностям предпочтительных антител к PD-L1, описанных в настоящем документе, причем антитело сохраняет функциональные свойства предпочтительных антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Например, антитела согласно настоящему изобретению включают в себя моноклональные антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, а переменная область легкой цепи содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34. Согласно другим вариантам осуществления аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут проявлять по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению к представленным выше последовательностям.

Некоторые варианты осуществления антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, каждая из которых содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3, при этом один или несколько из этих доменов CDR содержат последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностями, которые такие же, как и последовательности CDR предпочтительных антител к PD-L1, описанных в настоящем документе (например, 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4), или их консервативных модификаций, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства предпочтительных антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению.

На основании доказательств того, что CDR3 тяжелой цепи представляет собой первичную детерминанту специфичности и аффинности связывания антитела, как правило, соответствует действительности то, что как только определяется последовательность CDR3 тяжелой цепи данного антитела, изменчивость в других пяти последовательностях CDR не сильно влияет на специфичность связывания этого

антитела. Таким образом, антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению включают выделенные антитела, содержащие 6 CDR, причем антитела определяют путем указания последовательности домена CDR3 тяжелой цепи.

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению также включают в себя выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-L1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 человека с любым из человеческих моноклональных антител 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4. Таким образом, антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению включают в себя выделенные антитела или их антигенсвязывающие участки, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с эталонным антителом или с эталонным его антигенсвязывающим участком, содержащим: (a) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25; (b) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26; (c) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27; (d) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28; (e) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29; (f)

вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30; (g) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31; (h) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32; (i) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33; или (j) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34.

Способность антитела перекрестно конкурировать с любым из 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4 за связывание с человеческим PD-L1 показывает, что такое антитело связывается с той же областью эпитопа каждого из 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, соответственно. Все выделенные антитела, которые связываются с той же областью эпитопа PD-L1 человека, что и человеческое моноклональное антитело 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 или 13G4, относятся к числу антител согласно настоящему изобретению. Эти перекрестно конкурирующие антитела, как ожидается, будут характеризоваться очень похожими функциональными свойствами в силу их связывания с той же областью эпитопа PD-L1. Например, было показано, что

перекрестно конкурирующие моноклональные антитела к PD-L1 3G10, 1B12, 13G4, 12A4 (BMS-936559), 10A5, 12B7, 11E6 и 5F8, характеризуются аналогичными функциональными свойствами (смотрите патент США № 7943743 на примерах 3-11), в то время как моноклональное антитело 10H10, которое связывается с другой областью эпитопа, ведет себя по-другому (патент США № 7943743 в примере 11). Чем выше степень перекрестной конкуренции, тем более похожими будут функциональные свойства. Кроме того, перекрестно конкурирующие антитела могут быть определены в стандартных анализах связывания PD-L1, например, анализе Biacore, ELISA или проточной цитометрии, которые хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека или связываются с той же областью эпитопа PD-L1 человека, что и 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 или 13G4, представляют собой моноклональные антитела, предпочтительно химерные антитела или более предпочтительно гуманизированные или человеческие антитела. Такие моноклональные антитела человека могут быть получены и выделены, как описано в патенте США № 7943743.

Данные, представленные в примере 2, показывают, что каждое из человеческих моноклональных антител к PD-L1 5F8, 7H1, 1B12, 3G10, 10A5, 11E6, 12A4, 12B7 и 13G4, т.е., все из исследованных человеческих моноклональных антител, кроме 10H10, существенно блокировали связывание моноклональных антител, 3G10, 10A5, 11E6, 12A4 и 13G4 с клетками яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующими клетки PD-L1. Человеческое моноклональное антитело 10H10 существенно блокировало связывание только само по себе с клетками CHO/PD-L1. Эти данные показывают, что 3G10, 10A5, 11E6, 12A4 и 13G4 перекрестно конкурируют со всеми исследованными человеческими моноклональными антителами, за исключением 10H10, за связывание с той же областью эпитопа PD-L1 человека (фиг. 2A-F).

Данные, представленные в примере 3, показывают, что связывание человеческого моноклонального антитела 12A4 с клетками карциномы яичника ES-2, экспрессирующими клетки PD-L1, по существу, блокировалось самим 12A4 и 1B12 и 12B7, и блокировалось от умеренной до значительной степени моноклональными антителами 5F8, 10A5, 13G4 и 3G10, но не блокировалось моноклональным антителом 10H10. Эти данные в значительной степени согласуются с данными в примере 2 и показывают, что само по себе 12A4 и 2 других человеческих моноклональных

антитела, 12B7 и 1B12, по существу, перекрестно конкурируют с 12A4 в связывании с той же областью эпитопа, возможно, с тем же эпитопом PD-L1 человека; 5F8, 10A5, 13G4 и 3G10, проявляют значительный, но более низкий уровень перекрестной конкуренции с 12A4, предполагая, что эти моноклональные антитела могут связываться с эпитопами, которые перекрывают эпитоп 12A4; в то время как 10H10 не перекрестно конкурирует с 12A4 (фиг. 3), предполагая, что это моноклональное антитело связывается с другой областью эпитопа из 12A4.

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению также включают в себя антитела, сконструированные, начиная с антител, содержащих одну или несколько последовательностей V_H и/или V_L , раскрытых в настоящем документе, при этом сконструированные антитела могут изменять свойства исходного антитела. Антитело к PD-L1 может быть сконструировано с помощью различных модификаций, как описано выше для конструирования модифицированного антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению.

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению также включают в себя выделенные антитела, отобранные за их способность связываться с PD-L1 в фиксированных формалином, заключенных в парафин (FFPE) образцах ткани. Использование образцов FFPE характеризуется важным значением для долгосрочного последующего анализа корреляции между экспрессией PD-L1 в опухолях и прогноза или прогрессирования заболевания. Тем не менее, исследования по измерению экспрессии PD-L1 часто проводили на замороженных образцах из-за трудностей в выделении антител к PD-L1 человека, которые могут быть использованы для окрашивания PD-L1 в FFPE образцах с ИHC в целом (Hamanishi *et al.*, 2007) и, в частности, антитела, которые специфически связываются с мембранными PD-L1 в этих тканях. Использование различных антител для окрашивания PD-L1 в замороженных против FFPE тканей, и способность определенных антител отличать мембранные и/или цитоплазматические формы PD-L1, может объяснить некоторые из разрозненных данных, представленных в литературе, коррелирования экспрессии PD-L1 с прогнозом заболевания (Hamanishi *et al.*, 2007; Gadiot *et al.*, 2011). В этом изобретении предусмотрено несколько кроличьих моноклональных антител, которые специфически связываются с высокой аффинностью с мембранными PD-L1 человека в FFPE образцах тканей, содержащих опухолевые клетки и проникающие в опухоли воспалительные клетки.

Кроличьи и мышинные моноклональные антитела к hPD-L1 получали, как описано в примере 9. Из почти 200 подвергнутых скринингу множественных клонов антител только у десяти кроличьих множественных клонов антител была обнаружена способность специфического обнаружения мембранной формы PD-L1, и первую пятерку множественных клонов (обозначенных № 13, 20, 28, 29 и 49) затем субклонировали. Клон, который производил самое надежное специфическое обнаружение мембранных PD-L1, клон 28-8 кролика, был выбран для анализа ИНС. Последовательности переменных областей моноклонального антитела 28-8 приведены в SEQ ID NO: 35 и 36, соответственно. Последовательности доменов CDR тяжелой и легкой цепи моноклонального антитела 28-8, как это описано с использованием системы Kabat, изложены в SEQ ID NO: 37-42. Кроличьи клоны 28-1, 28-12, 29-8 и 20-12 были следующими лучшими моноклональными антителами с точки зрения надежного обнаружения мембранных PD-L1 в FFPE тканях.

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению также включают в себя антигенсвязывающие фрагменты вышеуказанных антител, в том числе Fab, F(ab')₂ Fd, Fv и scFv, ди-scFv или би-scFv и scFv-Fc фрагменты, диатела, триатела, тетраатела и отдельные CDR (смотрите Hollinger and Hudson, 2005; Olafsen and Wu, 2010, для получения более подробной информации).

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенным молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют любое из антител согласно настоящему изобретению. Эти нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может или может не содержать интронные последовательности. Согласно предпочтительному варианту осуществления нуклеиновая кислота представляет собой кДНК.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием стандартных техник молекулярной биологии. Для антител, экспрессированных с помощью гибридом (например, гибридом, полученных из трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, сделанные с помощью гибридомы, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации или

техник клонирования кДНК. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, полученные из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с использованием техник фагового дисплея), могут быть выделены из библиотеки.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению представляют собой те, которые кодируют последовательности V_H и V_K человеческих моноклональных антител к PD-1, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4 (раскрыты в патенте США № 8008449), и те, которые кодируют последовательности V_H и V_K человеческих моноклональных антител к PD-L1, 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, и 13G4 (раскрыты в патенте США № 7943743). Выделенная ДНК, кодирующая область V_H , может быть конвертирована в ген полноразмерной тяжелой цепи посредством оперативного связывания кодирующей V_H ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}), последовательности которых известны в настоящей области техники и могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но предпочтительно константную область IgG1 или IgG4. Аналогичным образом, выделенная ДНК, кодирующая область V_L , может быть конвертирована в ген полноразмерной легкой цепи посредством оперативного связывания кодирующей V_L ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи (C_L), последовательность которой известна в настоящей области техники и может быть получена с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда, но наиболее предпочтительно представляет собой константную область каппа.

Фармацевтические композиции

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть составлены в композицию, например, в фармацевтическую композицию, содержащую одно антитело или комбинацию антител, или его антигенсвязывающий участок (участки), и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие всасывание средства и т.п., которые физиологически совместимы. Предпочтительно носитель пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального

введения (например, путем инъекции или инфузии). Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей, антиоксидант, водные и неводные носители и/или адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства.

Схемы лечения устанавливают, чтобы обеспечить оптимальную желаемую реакцию, например, терапевтический ответ, или минимальные нежелательные явления. Для введения антитела к PD-1 или к PD-L1 диапазоны доз составляют от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг/кг, как правило, от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 мг/кг и более обычно от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта. Предпочтительно, дозировка составляет в пределах 0,1-10 мг/кг веса тела. Например, дозы могут составлять 0,1, 0,3, 1, 3, 5 или 10 мг/кг веса тела, и более предпочтительно, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг массы тела. Режим дозирования, как правило, разрабатывается для достижения воздействий, которые приводят к длительной занятости рецепторов (RO) на основе типовых фармакокинетических свойств антитела. Иллюстративный режим лечения включает в себя введение один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в 3 месяца или раз в три-6 месяцев. Доза и дозирование может меняться в течение курса лечения. Например, график дозировки может включать введение антитела: (i) один раз в две недели в 6-недельных циклах; (ii) каждые четыре недели в течение шести доз, затем каждые три месяца; (iii) каждые три недели; (iv) 3-10 мг/кг массы тела один раз с последующим 1 мг/кг массы тела каждые 2-3 недели. Учитывая, что антитело IgG4, как правило, характеризуется периодом полужизни, равным 2-3 недели, предпочтительный режим дозирования для антитела к PD-1 или к PD-L1 согласно настоящему изобретению включает 0,3-10 мг/кг веса тела, предпочтительно 3-10 мг/кг веса тела, более предпочтительно от 3 мг/кг массы тела с помощью внутривенного введения, с введением антитела каждые 14 дней в 6-недельном или 12-недельном циклах до полного ответа или подтверждения прогрессирования заболевания.

В некоторых способах два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания вводят одновременно, и в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Антитело обычно вводят по несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут быть, например, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно, раз в три месяца или раз в год. Интервалы могут также быть нерегулярными, как указано

посредством измерения уровней в крови антитела к антигену-мишени у пациента. В некоторых способах дозировка регулируется для достижения концентрации антитела в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах приблизительно 25-300 мкг/мл.

Кроме того, антитело можно вводить в виде композиции с пролонгированным высвобождением, в случае которой требуется менее частое введение. Дозировка и частота изменяются в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. Как правило, человеческие антитела демонстрируют самый длинный период полужизни, а затем следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и отличные от человеческих антитела. Дозировка и частота приема могут изменяться в зависимости от того, представляет собой лечение профилактическое или терапевтическое. При профилактическом применении относительно низкую дозировку, как правило, вводят относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся часть их жизни. При терапевтическом применении иногда требуются относительно высокие дозы при относительно коротких промежутках времени до того, пока прогрессирование заболевания не уменьшается или не прекращается, и, предпочтительно, пока пациент показывает частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациенту можно вводить профилактическую схему лечения.

Действительные уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут варьировать так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, композиции и способа введения без неоправданной токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включающих в себя активность конкретных используемых композиций согласно настоящему изобретению, применяемого пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретными композициями, возраста, пола, веса, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни пациента, подвергаемого лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины. Композиция согласно настоящему изобретению может быть введена с помощью одного или нескольких способов введения с использованием одного или нескольких из множества способов,

хорошо известных в настоящей области техники. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов.

Применения и способы настоящего изобретения

Антитела, композиции антител, нуклеиновые кислоты и способы согласно настоящему изобретению характеризуются многочисленными свойствами *in vitro* и *in vivo*, включающими в себя, например, способы определения и количественную оценку экспрессии PD-1 или PD-L1, включающие связывание антител с полипептидами-мишенями, или измерение количества нуклеиновой кислоты, кодирующей эти полипептиды, и способ иммунотерапии субъекта, пораженного заболеванием, включающий введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество терапевтического средства, которое ингибирует передачу сигнала от ингибиторного иммунорегулятора. Согласно предпочтительным вариантам осуществления последнего способа ингибиторный иммунорегулятор представляет собой компонент сигнального пути PD-1/PD-L1, и терапевтическое средство нарушает передачу сигналов от этого пути. Более предпочтительно, терапевтическое средство представляет собой антитело, которое препятствует взаимодействию между PD-1 и PD-L1. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления данного способа антитело специфически связывается с PD-1 и блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD-L1 и блокирует взаимодействие PD-L1 с PD-1 и/или B7-1 (CD80). Таким образом, настоящее изобретение включает способы для усиления иммунного ответа у субъекта, включающие введение антитела к PD-1 и/или к PD-L1 для нарушения взаимодействия между PD-1 и PD-L1, и способы лечения заболеваний, опосредованных таким усилением иммунного ответа. Когда антитела к PD-1 и PD-L1 вводят вместе, два могут быть введены последовательно в любом порядке или одновременно. Согласно некоторым аспектам в этом изобретении предусмотрены способы модификации иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела к PD-1 и/или к PD-L1 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего участка так, чтобы иммунный ответ у субъекта модифицировался. Предпочтительно иммунный ответ увеличивается, усиливается, стимулируется или повышающе регулируется. Согласно предпочтительным

вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению представляют собой человеческие антитела.

Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, нуждающихся в повышении иммунного ответа. Иммунотерапевтические способы, описанные в настоящем документе, представляют собой особенно подходящие для лечения пациентов-людей с нарушением, которое можно лечить путем усиления опосредованного Т-клетками иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам осуществления способы применяются для лечения субъектов, страдающих от заболевания, вызванного инфекционным патогеном. Согласно предпочтительным вариантам осуществления способы применяются для лечения субъектов, страдающих от или подверженных риску злокачественной опухоли.

Иммунотерапия злокачественной опухоли

Было показано, что блокада взаимодействия PD-1/PD-L1 усиливает иммунные ответы *in vitro* (патенты США № 8008449 и 7943743; Fife *et al.*, 2009) и опосредует доклиническую противоопухолевую активность (Dong *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2002). Однако, молекулярные взаимодействия, потенциально блокированные этими двумя антителами, не идентичны: антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению нарушают взаимодействия PD-1/PD-L1 и потенциально PD-1/PD-L2; в отличие от этого, в то время как антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению также нарушают взаимодействия PD-1/PD-L1, они не блокируют взаимодействия PD-1/PD-L2, но вместо этого могут нарушать PD-1-независимое взаимодействие PD-L1/CD80, которые также, как было показано, понижающе модулируют Т-клеточные реакции *in vitro* и *in vivo* (Park *et al.*, 2010; Paterson *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Butte *et al.*, 2007; Butte *et al.*, 2008). Таким образом, вполне возможно, что среди этих различных пар лиганд-рецептор различные взаимодействия могут доминировать в различных типах злокачественных опухолей, способствуя разнородным профилям активности для двух антител.

Нарушение взаимодействия PD-1/PD-L1 антагонистическими антителами может усиливать иммунный ответ к злокачественным клеткам у пациента. PD-L1 не экспрессируется в нормальных клетках человека, но в избытке в различных злокачественных опухолях человека (Dong *et al.*, 2002). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 ухудшает Т-клеточные ответы, что проявляется уменьшением проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) и уменьшением опосредованной рецептором пролиферации Т-клеток, что приводит к толерантности, истощению или апоптозу Т-

клеток и иммунному уклонению злокачественных клеток (Zou and Chen, 2008; Blank *et al.*, 2005; Konishi *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2003; Iwai *et al.*, 2002). Иммунная супрессия может быть отменена путем ингибирования локального взаимодействия между PD-L1 и PD-1 с использованием антитела к PD-1 и/или к PD-L1. Эти антитела могут быть использованы отдельно или в комбинации для ингибирования роста раковых опухолей. Кроме того, один или оба из этих антител могут быть использованы в сочетании с другими иммуногенными и/или противораковыми средствами, включающими в себя цитокины, стандартные химиотерапии злокачественных опухолей, вакцины, радиацию, хирургию или другие антитела.

Иммунотерапия пациентов со злокачественными опухолями с использованием антитела к PD-1

В настоящем изобретении предусмотрен способ иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, который включает введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего участка, что нарушает взаимодействие PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. В этом изобретении также предусмотрен способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего участка, что нарушает взаимодействие PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, в количестве, эффективном для ингибирования роста опухолевых клеток. Согласно предпочтительным вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий участок. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой изотип IgG1 или IgG4. Согласно другим вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок. Согласно другим вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело или его антигенсвязывающий участок. Согласно предпочтительным вариантам осуществления для лечения пациента-человека антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий участок.

Клинические испытания, описанные в примерах, использовали человеческое моноклональное антитело к PD-1, ниволумаб (обозначенный 5C4 в патенте США № 8008449), для лечения злокачественной опухоли. В то время как 5C4 выбирали в качестве ведущего антитела для ввода в клинику, следует отметить, что некоторые антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению разделяют с 5C4 функциональные свойства, которые важны для терапевтической активности 5C4, включающие в себя высокую аффинность специфического связывания с PD-1 человека, увеличение пролиферации Т-клеток, секрецию IL-2 и производство интерферона- γ в анализе MLR, ингибирование связывания PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1 и ингибирование роста опухолевых клеток *in vivo*. Кроме того, некоторые антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению, 17D8, 2D3, 4H1 и 7D3, структурно связаны с 5C4 в содержащих областях V_H и V_K , которые содержат последовательности, полученные из последовательностей 3-33 V_H и L6 V_K зародышевой линии, соответственно. Кроме того, 5C4, 2D3, 7D3, 4H1 и 17D8 все перекрестно конкурируют за связывание с той же областью эпитопа hPD-1 (пример 1). Таким образом, доклиническая характеристика ниволумаба и других человеческих моноклональных антител к PD-1 показывает, что способы лечения злокачественной опухоли, предусмотренные в настоящем документе, могут быть выполнены с использованием различных антител, выбранных из широкого рода антител к PD-1 согласно настоящему изобретению.

Соответственно, некоторые варианты осуществления раскрытых в настоящем документе способов иммунотерапии включают введение пациенту антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего участка, содержащего: (a) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-33 V_H зародышевой линии человека, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 V_K зародышевой линии человека, или (b) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 4-39 V_H зародышевой линии человека, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L15 V_K зародышевой линии человека.

Согласно некоторым другим вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, который вводят пациенту, перекрестно конкурирует за связывание с PD-1 с эталонным антителом или эталонным его антигенсвязывающим участком, содержащим: (a) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8; (b) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9; (c) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10; (d) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11; (e) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12; (f) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13; или (g) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область

легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок перекрестно конкурирует за связывание с PD-1 с ниволумабом.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов иммунотерапии, раскрытых в настоящем документе, вводимое пациенту антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий участок содержит: (a) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8; (b) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9; (c) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10; (d) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11; (e) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12; (f) переменную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи человека, содержащую

последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13; или (g) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14. Согласно предпочтительным вариантам осуществления к антителу PD-1 или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящих способов антитело к PD-1 составляют для внутривенного введения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело вводят внутривенно в дозе 3 мг/кг в течение 60 мин каждые 2 недели. Как правило, лечение продолжается до тех пор, пока наблюдается клиническая польза или до тех пор, пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания.

В клинических испытаниях иммунотерапии к PD-1, описанной в приведенных ниже примерах, наблюдались интересные OR с прочными клиническими ответами даже у подвергнутых интенсивному предварительному лечению пациентов при различных видах опухолей, включая в себя значительную долю пациентов с NSCLC, MEL и RCC, и различных участков метастазирования, включающих в себя печень, легкие, лимфатические узлы и кости. MEL и RCC рассматриваются как иммуногенные новообразования, которые, как ранее было показано, отвечают на иммунотерапию злокачественной опухоли, например, интерферон-альфа и интерлейкина-2 как в MEL, так и в RCC (Eton *et al.*, 2002; Coppin *et al.*, 2005; McDermott and Atkins, 2006) и антитело к CTLA-4 в MEL (Hodi *et al.*, 2010). У пациентов с MEL, значительные ORR наблюдались с ниволумабом при различных дозах, составляющих 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг, с общим показателем отклика, равным приблизительно 31%, а также сопоставимые ORR, равные приблизительно 30%, наблюдались у пациентов с RCC, получавших ниволумаб в дозах 1 или 10 мг/кг (смотрите пример 7). В отличие от

этого, иммунотерапия исторически характеризовалась минимальным успехом при раке легких. Это отсутствие успеха было связано с NSCLC, представляющим собой "неиммуногенный" (смотрите, например, Holt and Disis, 2008; Holt *et al.*, 2011). Способность рака легких препятствовать иммунной системе происходит от многих факторов, включающих в себя секрецию иммуносупрессивных цитокинов, потерю главного комплекса гистосовместимости экспрессии антигенов и кооптацию Т-клеточных ингибиторных путей (Dasanu *et al.*, 2012; Marincola *et al.*, 2000; Brahmer *et al.*, 2012).

Несмотря на ограниченную эффективность иммунотерапии, исторически замеченную при раке легких, и разнообразных механизмов, используемых клетками рака легких, чтобы уклониться от атаки иммунной системы, различные вакцины опухолевых клеток (например, belagenpumatucel-L, основанная на целых клетках вакцина, которая блокирует действие TGF- β 2) и вакцины на основе антигенов (например, гуморальная вакцина EGF и вакцины, включающие слитый белок MAGE-A3 или его части связанного с опухолями антигена MUC1), которые усиливают антигенспецифический противоопухолевый иммунитет, в настоящее время оцениваются в клинических испытаниях (Holt *et al.*, 2011; Shepherd *et al.*, 2011; Dasanu *et al.*, 2012; Brahmer *et al.*, 2012). Тем не менее, в то время как такие антигенспецифические вакцины показали некоторые надежды на лечение NSCLC, Holt *et al.* (2011) отметил, что исследованиям с участием неспецифических иммунотерапевтических вмешательств не удалось улучшить результаты при NSCLC, что указывает на необходимость объединить их с антигенспецифическими вакцинами. Эти авторы высказали мнение, что по-настоящему эффективной иммунотерапией NSCLC будет только эффект от реализации стратегий как дополняющего противоопухолевого иммунитета, так и противодействия опосредованной опухолью иммуносупрессии, и пришли к выводу, что существующие или слабые зарождающиеся иммунные реакции у пациентов с NSCLC делают маловероятным то, что неспецифическая стимуляция иммунной системы или удаление иммуносупрессии будет создавать изменения в клинических исходах.

Таким образом, приведенные в настоящем документе результаты с NSCLC особенно производят впечатление, неожиданны и удивительны. У пациентов с NSCLC OR наблюдались при дозах ниволумаба, равных 1, 3 или 10 мг/кг с частотой отклика, составляющей 3%, 24% и 20%, соответственно (смотрите пример 7). OR наблюдались в гистологиях NSCLC: 9 ответивших на лечение из 54 плоскоклеточных (17%) и 13

ответивших на лечение из 74 неплоскоклеточных (18%). Этот уровень активности, наблюдавшейся с ниволумабом у пациентов с NSCLC с интенсивной предшествующей терапией (54% с 3-мя линиями предшествующей терапии) и в гистологии представляет собой беспрецедентный показатель, особенно у пациентов с плоскоклеточной гистологией (смотрите Gridelli *et al.*, 2008; Miller, 2006), и обеспечивает очень благоприятную динамику польза/риск относительно эффективности и безопасности, по сравнению с существующими стандартами лечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящих способов иммунотерапии антитело к PD-1 указывается как монотерапия для местного прогрессирующего или метастатического плоскоклеточного или неплоскоклеточного NSCLC после терапии на основе платины (независимо от поддержания) и одного другого лечения. Согласно другим вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для местного прогрессирующего или метастатического плоскоклеточного или неплоскоклеточного NSCLC после потери эффективности терапии на основе платины и одной другой предшествующей химиотерапии. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для местного прогрессирующего или метастатического плоскоклеточного или неплоскоклеточного NSCLC после провала двух линий терапии, одна из которых должна содержать основанную на платине схему лечения. Согласно еще дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для местного прогрессирующего или метастатического плоскоклеточного или неплоскоклеточного NSCLC после провала по меньшей мере одной предшествующей химиотерапии, после провала по меньшей мере одной предшествующей основанной на платине терапии или после прогрессирования на по меньшей мере одной платиновой дублетной терапии. Во всех раскрытых в настоящем документе способах иммунотерапии лечение может быть продолжено до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или до тех пор, пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания.

Прочность клинических ответов на антитело к PD-1 у пациентов со злокачественной опухолью с интенсивной предшествующей терапией

Решающая роль пути PD-1 в подавлении противоопухолевого иммунитета, впервые показанная в лабораторных моделях, в настоящее время подтверждена в клинических исследованиях. Как описано в настоящем документе, монотерапия лекарственными

средствами, блокирующими PD-1 (ниволумаб) или его основного лиганда PD-L1 (BMS-936559), может опосредовать регрессию у пациентов с устойчивой к лечению прогрессирующей злокачественной опухолью. Частота объективных ответов (ORR) у пациентов с NSCLC с интенсивной предшествующей терапией, получающих антитело к PD-1, включая в себя пациентов с плоскоклеточной гистологией, удивительна и неожиданна, так как стандартные терапии спасения исторически показывают умеренную пользу у таких пациентов (Scagliotti *et al.*, 2011). Как измеряется стандартным RECIST в настоящем исследовании, OR были долговечны, со средними длительностями реакции, равными приблизительно 18 месяцев у 22 из 129 респондентов ((смотрите пример 7). Кроме того, наблюдались паттерны регрессии опухоли, согласующиеся со связанными с иммунитетом паттернами ответа.

Эти данные установили путь PD-1 в качестве нового терапевтического фокуса в онкологии (Pardoll, 2012; Topalian *et al.*, 2012c; Hamid and Carvajal, 2013). В текущем исследовании, в котором у 54% пациентов наблюдалось прогрессирующее заболевание с 3 или более предыдущими системными схемами лечения, предварительный анализ был проведен до марта 2013 г. Этот обновленный анализ был поддержан и подкреплён данными и выводами, полученными и сделанными из более ранних анализов от февраля 2012 г. Таким образом, обычные OR или длительная стабилизация заболевания были зарегистрированы у пациентов с NSCLC (17% и 10% соответственно), MEL (31%, 7%) и RCC (29%, 27%) во всех испытанных дозах (смотрите пример 7). Кроме того, 13 пациентов (4%) проявляли необычные "связанные с иммунной системой" паттерны ответов, как описано выше с анти-CTLA-4 терапией, некоторые из которых были длительными (Sharma *et al.*, 2011).

Долговечность OR при различных видах злокачественных опухолей у пациентов, получавших антитело к PD-1, особенно заметна. Обновленные анализы снова подчеркнули долговечность клинической активности у получавших ниволумаб пациентов, которая, как правило, не наблюдается с химиотерапией или низкомолекулярными ингибиторами на сегодняшний день, но наблюдается у некоторых пациентов с меланомой, получающих иммунотерапию, включающую в себя ипилимумаб и высокие дозы интерлейкина-2 (Topalian *et al.*, 2011; Hodi *et al.*, 2010). Сохранение частичной регрессии опухоли после отмены лекарственного средства предполагает, что блокада PD-1 сбрасывает иммунное равновесие между опухолью и хозяином, и выгода OS в конечном итоге может оказаться значительно большей, чем была измерена на сегодняшний день. Дальнейшее наблюдение

необходимо, чтобы определить окончательную прочность регрессии опухоли и стабилизацию заболевания у пациентов, находящихся на этих клинических испытаниях.

Примечательно, что прочная объективная регрессия опухоли и стабилизация заболевания, индуцируемые ниволумабом у пациентов с интенсивной предшествующей терапией с прогрессирующим NSCLC, MEL и RCC, переводится на результаты выживания, которые превосходят исторические данные для этих групп пациентов, получавших обычную химиотерапию и/или лечение с ингибитором тирозинкиназы (TKI). При NSCLC, 1- и 2-летняя выживаемость была у 42% и 14%, соответственно, а средняя OS составляла 9,2 и 10,1 месяцев у пациентов с плоскоклеточным и не плоскоклеточным раком, соответственно (смотрите пример 7). Такой высокий уровень эффективности особенно впечатляет, так как 54% из этих пациентов получали 3 или более предшествующих курсов лечения. Кроме того, поскольку наблюдение за многими больными раком легких было относительно ограниченным, эти цифры могут измениться при обработке данных. Исторически, химиотерапия 2L рака легких (например, доцетаксел и пеметрексед) добилась средней OS, равной 7,5-8,3 месяцев, и однолетней выживаемости приблизительно у 30% (Shepherd *et al.*, 2000; Hanna *et al.*, 2004). В популяции 2L/3L принимающие эрлотиниб пациенты характеризовались средней выживаемостью, равной 6,7 месяцев, по сравнению с 4,7 месяцами в группе плацебо (Shepherd *et al.*, 2005). Никакой способ лечения в настоящее время не одобрен для использования при раке легких превышающем 3L, и существуют минимальные данные базового выживания в данной популяции пациентов, за исключением ретроспективных обзоров медианного выживания, составляющего 5,8-6,5 месяцев и 1-летней выживаемости у 25% (Girard *et al.*, 2009; Scartozzi *et al.*, 2010).

При лечении ниволумабом пациентов с MEL достигалась медиана OS, составляющая 16,8 месяцев, с выживаемостью, равной 62% (1 год) и 43% (2 года) (смотрите пример 7). Результаты выживания у пациентов с меланомой с предшествующей терапией поддержали недавние утверждения FDA ипилимумаба и вемурафениба. В недавней фазе 3 испытании поступивших пациентов с меланомой по меньшей мере с одним предварительным лечением метастатического заболевания, ипилимумаб увеличивал среднюю OS от 6,4 до 10,1 месяцев, по сравнению с пептидной вакциной gp100 (Hodi *et al.*, 2010). В фазе 2 испытания ипилимумаба у ранее получавших лечение больных, 2-летняя выживаемость составляла от 24,2-32,8% (Lebbe *et al.*, 2012). Медиана OS у

пациентов с предшествующей терапией с BRAF-мутантной меланомой, зарегистрированного на большой фазе 2 вемурафениба, составляла 15,9 месяцев, а 1-летняя выживаемость составила 58% (Sosman *et al.*, 2012).

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления иммунотерапия с антителом к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического MEL после терапии с дакарбазином (независимо от поддерживающего лечения) и одного другого воздействия. Согласно другим вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического MEL после провала основанной на дакарбазине терапии. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического MEL после провала двух линий терапии, одна из которых должна включать в себя основанную на дакарбазине схему лечения. Согласно еще дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического MEL после по меньшей мере одной предшествующей химиотерапии после провала по меньшей мере одной предварительной основанной на дакарбазине терапии, или после прогрессирования по меньшей мере на терапии с дакарбазином. Во всех раскрытых в настоящем документе способах иммунотерапии лечение может быть продолжено до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не произойдет неуправляемая токсичность или прогрессирования заболевания.

У получавших ниволумаб пациентов с RCC, среди которых 45% получили 3 или более предварительных курса лечения и 71% получили предварительную антиангиогенную терапию, медианная OS была достигнута в 22 месяца (по данным анализа на март 2013 г.). Наблюдались граничные уровни выживаемости 70% (1 год) и 50% (2 года) (смотрите пример 7). В недавней фазе 3 испытания включенных в исследование пациентов с раком почки, чье заболевание прогрессировало после антиангиогенной терапии, эверолимус сравнивали с плацебо: медианная OS составляла 14,8 против 14,4 месяцев, соответственно (Motzer *et al.*, 2008; Motzer *et al.*, 2010). В недавней фазе 3 испытания по сравнению сорафениба с темсиролимусом в популяции пациентов с устойчивым к сунитинибу раком полученная медианная OS составляла 16,6 и 12,3 месяцев, соответственно (Hutson *et al.*, 2012). Таким образом, как в случае с NSCLC, так и MEL, лечение популяции пациентов с RCC с интенсивной предшествующей терапией ниволумабом давало значительно большую медианную OS (> 22 месяцев),

чем лечение менее устойчивой популяции стандартной терапией. Контролируемые испытания фазы 3 с перспективными конечными точками выживания ведутся в NSCLC, MEL и RCC (NCT01673867, NCT01721772, NCT01642004, NCT01668784 и NCT01721746 (смотрите сайт клинических испытаний, <http://www.clinicaltrials.gov>). Ожидается, что результаты этих исследований в дальнейшем продемонстрируют высокую эффективность и долговечность ответов на ниволумаб при этих злокачественных опухолях, по сравнению со стандартными способами лечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления иммунотерапия с антителом к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического RCC после терапии с антиангиогенным TKI или ингибитором mTOR (независимо от поддерживающего лечения) и одного другого воздействия. Согласно другим вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического RCC после провала терапии с антиангиогенным TKI или ингибитором mTOR. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического RCC после провала двух линий терапии, одна из которых должна включать в себя антиангиогенный TKI или ингибитор mTOR. Согласно еще дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 указывается как монотерапия для локального прогрессирующего или метастатического RCC после по меньшей мере одной химиотерапии после провала по меньшей мере одной предварительной основанной на антиангиогенном TKI или ингибиторе mTOR терапии или после прогрессирования на по меньшей мере терапии с антиангиогенным TKI или ингибитором mTOR. Иммунотерапия к PD-1 может быть продолжена до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания.

Примечательно, что OS у пациентов с раком легких, меланомой и раком почки, получающих ниволумаб, была значительно длинее, чем PFS. Эти результаты отражают таковые для ипилимумаба (Hodi *et al.*, 2010), а также отражают наблюдение о том, что раннее опухолевое расширение или появление новых очагов у некоторых пациентов, получающих блокаду иммунных контрольных точек, может развиваться стабилизация заболевания или регрессия. Эти результаты показывают, что выживаемость без прогрессирования не может быть оптимальной конечной точкой для определения эффективности ниволумаба и других средств в этом классе.

Представленные в настоящем документе данные, демонстрирующие высокую эффективность, прочность и широкую применимость иммунотерапии к PD-1 для лечения злокачественной опухоли, привели к тому, что ниволумаб проходил проверку на дополнительные виды злокачественных опухолей. Например, на основании того, что повышенная экспрессия PD-L1 сообщалась с различными гематологическими злокачественными новообразованиями и может предотвращать иммунный ответ хозяина от оказывания благотворного воздействия на злокачественные клетки, было инициировано испытание, чтобы подтвердить способность ниволумаба опосредовать противоопухолевую активность у пациентов с онкогематологическими заболеваниями (множественная миелома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома и хронический миелолейкоз) (NCT01592370). Ниволумаб также проходит испытания в качестве монотерапии при прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциноме (NCT01658878).

В целом, описанные в настоящем документе результаты иммунотерапии к PD-1 замечательны по меньшей мере следующими тремя особенностями. Во-первых, была показана эффективность анти-PD-1, превосходящая исторические данные по эффективности для пациентов на стандартных способах лечения злокачественной опухоли. Примечательно, что подобная эффективность была продемонстрирована у пациента в популяции с интенсивной предшествующей терапией, в которой приблизительно у половины пациентов наблюдалось прогрессирующее заболевание после 3 или более предшествующих системных схем лечения. Такие пациенты, страдающие от прогрессирующих, метастатических и/или устойчивых злокачественных опухолей, как известно, трудно поддаются лечению. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способы для иммунотерапии пациента, страдающего от прогрессирующей, метастатической и/или устойчивой злокачественной опухоли, при этом способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего участка, что нарушает взаимодействие PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из описанных в настоящем документе терапевтических способов субъект подвергался предварительному лечению от злокачественной опухоли; например, субъект подвергался по меньшей мере одной, двум или трем предшествующим линиям терапии злокачественной опухоли.

Во-вторых, было показано, что настоящие терапевтические способы применимы к широкому роду различных видов злокачественных опухолей. Основываясь на

неожиданном открытии того, что даже "неиммуногенная" злокачественная опухоль, такая как NSCLC (Holt *et al.*, 2011), и такие трудноизлечимые злокачественные опухоли, как яичников и желудка (а также другие виды злокачественных опухолей, включающие в себя MEL, RCC и CRC) поддаются лечению с анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 (смотрите примеры 7 и 14), это изобретение в целом относится к способам иммунотерапии у пациента, страдающего от практически любой из очень широкого диапазона злокачественных опухолей.

В-третьих, было показано, что лечение с антителом к PD-1 или к PD-L1 производит поразительно прочную клиническую активность у пациентов со злокачественной опухолью. Соответственно, это изобретение включает иммунотерапевтические способы индукции прочного клинического ответа у пациента со злокачественной опухолью, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества антитело или его антигенсвязывающего участка, что нарушает взаимодействие PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Согласно предпочтительным вариантам осуществления любого из описанных в настоящем документе терапевтических способов клинический ответ представляет собой прочный ответ.

Используемый в настоящем документе "прочный" ответ представляет собой терапевтический или клинический ответ, который превышает предполагаемый медианный уровень OS в популяции пациентов. Предполагаемый медианный уровень OS изменяется с различными видами злокачественных опухолей и в различных группах пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления прочный ответа превышает ожидаемый медианный уровень OS в соответствующей популяции пациентов по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%. Основным преимуществом основанных на блокаде пути PD-1 иммунотерапевтических подходов может быть функциональное восстановление истощенных Т-клеток с долгосрочным поколением Т-клеток памяти, которые могут поддерживать противоопухолевый иммунный надзор и ингибировать рост опухоли в течение длительных периодов, распространяемых на многие годы, даже в отсутствие продолжения терапии (Kim and Ahmed, 2010). Действительно, долгосрочные последующие исследования на пациентах после прекращения терапии с ниволумабом подтвердили, что пациент с CRC испытывал полный ответ, который продолжается через 3 года; пациент с RCC испытывал частичный ответ продолжительностью 3 года после терапии, который преобразовался в полный ответ, который проводился 12

месяцев; и пациент с меланомой достигал частичного ответа, который был стабилен в течение 16 месяцев после лечения и рецидив заболевания был успешно излечен повторной терапией анти-PD-1 (Lipson *et al.*, 2013).

Связанные с иммунной системой клинические ответы

Стало очевидно, что обычные критерии ответа не могут адекватно оценить активность иммунотерапевтических средств, поскольку прогрессирующее заболевание (по предварительному рентгенографическому исследованию) не обязательно отражает неудачи лечения. Например, было показано, что воздействие антитела к CTLA-4, ипилимумаба, производит четыре различных паттерна отклика, все из которых были связаны с благоприятным выживанием: (а) сжатие в исходных поражениях без новых поражений; (b) прочное стабильное заболевание (у некоторых пациентов после медленного, неуклонного снижения общего бремени опухоли); (с) реакции после увеличения общего бремени опухоли и (d) реакция в присутствии новых поражений. Соответственно, чтобы правильно оценить иммунотерапевтические средства, долгосрочные эффекты на заболевании-мишени также должны быть захвачены. В связи с этим были предложены систематические критерии связанных с иммунной системой ответов (IRRC), которые делают скидку на раннее увеличение опухолевой нагрузки и/или появление новых очагов, и которые стремятся к укреплению характеристики паттернов связанных с иммунной системой ответов (Wolchok *et al.*, 2009). В то время как полный эффект этих нетрадиционных паттернов ответа остается определенным в рандомизированных испытаниях ниволумаба с конечными точками выживания, настоящие наблюдения напоминают результаты с ипилимумабом в которых наблюдалось значительное расширение OS у подвергнутых лечению пациентов (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011).

Общий профиль риск/польза иммунотерапии к PD-1 также благоприятен с низкой частотой более тяжелых, связанных с лекарственными средствами нежелательных явлений (AE;> 3-й степени тяжести), конкретные события, наблюдаемые на сегодняшний день, соответствуют другим иммунотерапевтическим средствам. Это говорит о том, что анти-PD-1 иммунотерапия может быть обеспечена в амбулаторных условиях с минимальной поддерживающей терапией.

Широкий спектр злокачественных опухолей, подвергаемых лечению с помощью анти-PD-1 иммунотерапии

Представленные в настоящем документе клинические данные показывают, что основанная на блокаде PD-1 иммунотерапия не ограничивается только

"иммуногенными" типами опухолей, такими как MEL и RCC, но распространяется на типы опухолей, обычно не рассматриваемые как связанные с иммунной системой, включающие в себя NSCLC. Неожиданные успехи с устойчивой к лечению метастатической NSCLC подчеркивают возможность того, что любые опухоли могут быть "иммуногенными" в контексте надлежащей иммунной модуляции, и предполагают, что блокада PD-1 как иммунотерапевтический подход широко применима в очень разнообразных типах опухолей. Таким образом, злокачественные опухоли, которые можно лечить с помощью антител к PD-1 согласно настоящему изобретению также включают в себя злокачественные опухоли, как правило, реагирующие на иммунотерапию, а также злокачественные опухоли, которые традиционно считались неиммуногенными. Не ограничивающие примеры предпочтительных злокачественных опухолей для лечения включают в себя NSCLC, MEL, RCC, CRC, CRPC, HCC, плоскоклеточную карциному головы и шеи, карциному пищевода, яичников, желудочно-кишечного тракта и молочной железы и гематологические злокачественные образования. Хотя NSCLC обычно не рассматривается как отвечающий на иммунотерапию, описанные в настоящем документе данные неожиданно показали, что как плоскоклеточный, так и неплоскоклеточный NSCLC реагирует на лечение с антителом к PD-1. Кроме того, настоящее изобретение включает для лечения устойчивых или рецидивирующих злокачественных образований, чей рост можно ингибировать с использованием антитела к PD-1 согласно настоящему изобретению.

Примеры злокачественных опухолей, которые можно лечить с использованием антитела к PD-1 в способах согласно настоящему изобретению, на основе показаний очень широкой применимости представленной в настоящем документе иммунотерапии к PD-1, включают в себя рак печени, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак легких, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак почки, рак матки, рак яичников, рак толстой и прямой кишок, рака толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак семенника, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника,

карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль оси позвоночника, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, плоскоклеточный рак, вызванный окружающей средой плоскоклеточный рак, включающий в себя вызванный воздействием асбеста, гематологические злокачественные образования, включающие в себя, например, множественную миелому, В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, неходжкинские лимфомы, острую миелоидную лимфому, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому предшественников В-клеток, лимфому клеток мантии, острый лимфобластный лейкоз, грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, Т-клеточную лимфому и лимфобластную лимфому предшественников Т-клеток, а также любые комбинации указанных видов злокачественных опухолей. Настоящее изобретение также применимо к лечению метастатических видов злокачественных опухолей.

Медицинские применения антител к PD-1

Один из аспектов настоящего изобретения заключается в использовании любого антитела к PD-1 или его антигенсвязывающий участка согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для ингибирования сигналов от пути PD-1/PD-L1 так, чтобы, таким образом, потенцировать эндогенный иммунный ответ у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли. Другой аспект заключается в использовании любого антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего участка согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для иммунотерапии у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, содержащей нарушение взаимодействия между PD-1 и PD-L1. Эти применения для приготовления лекарственных средств широко применимы к полному диапазону злокачественных опухолей, раскрытых в настоящем документе. Согласно предпочтительным вариантам осуществления этих применений злокачественные опухоли включают в себя плоскоклеточный NSCLC, неплоскоклеточный NSCLC, MEL, RCC, CRC, CRPC, HCC, плоскоклеточный рак головы и шеи и карциномы пищевода, яичников, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, а также гематологические злокачественные новообразования. Это изобретение также включает медицинское применение любого антитела к PD-1 или его

антигенсвязывающего участка согласно настоящему изобретению, соответствующего всем вариантам осуществления способов лечения, использующих описанное в настоящем документе антитело к PD-1.

Настоящее изобретение также включает антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий участок согласно настоящему изобретению для применения в лечении субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающем потенцирование эндогенного иммунного ответа у субъекта путем ингибирования передачи сигналов от пути PD-1/PD-L1. Изобретение дополнительно включает антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий участок согласно настоящему изобретению для применения в иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающей нарушение взаимодействия между PD-1 и PD-L1. Эти антитела могут быть использованы в потенцировании эндогенного иммунного ответа против или в иммунотерапии полного спектра раскрытых в настоящем документе злокачественных опухолей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления злокачественные опухоли представляют собой плоскоклеточный NSCLC, неплоскоклеточный NSCLC, MEL, RCC, CRC, CRPC, HCC, плоскоклеточный рак головы и шеи и карциномы пищевода, яичников, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, а также гематологические злокачественные новообразования.

Комбинированная терапия, включающая в себя антитела к PD-1

В то время как в настоящем документе было показано, что монотерапия с антителами к PD-1 и к PD-L1 значительно увеличивает выживаемость пациентов с раком легких, меланомой, раком почки и потенциально другими злокачественными опухолями, доклинические данные указывают на то, что комбинации синергетического лечения, основанного на блокаде пути PD-1, могут характеризоваться еще более мощным воздействием. Клиническая оценка ниволумаба в сочетании с ипилимумабом (анти-CTLA-4), чей механизм действия похож, но отличается от ниволумаба (Parry *et al.*, 2005; Mellman *et al.*, 2011; Topalian *et al.*, 2012c) продолжается, и результаты испытания фазы I приведены в настоящем документе (смотрите также NCT01024231; NCT01844505; NCT01783938; Wolchok *et al.*, 2013a; Wolchok *et al.*, 2013b; Hodi *et al.*, 2013). Клинические исследования также были начаты с участием введения ниволумаба в комбинации с вакцинами меланомы (NCT01176461, NCT01176474; Weber *et al.*, 2013), с лирилумабом (BMS-986015), IgG4 человека к антителу KIR, у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями (NCT01714739; Sanborn *et al.*, 2013), цитокинами, например, IL-21, у пациентов с прогрессирующими или

метастатическими солидными опухолями (NCT01629758; Chow *et al.*, 2013), с химиотерапевтическими лекарственными средствами, например, с основанным на платине дублетом химиотерапии у химиотерапевтически-наивных пациентов с NSCLC (NCT01454102; Rizvi *et al.*, 2013) и низкомолекулярными нацеленно воздействующими лекарственными средствами у пациентов с метастатическим RCC (NCT01472081; Amin *et al.*, 2013).

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к комбинации антитела к PD-1 с различными способами лечения злокачественных опухолей, включающие в себя химиотерапевтические схемы лечения, радиацию, хирургию, гормональную депривацию и ингибиторы ангиогенеза, для лечения различных злокачественных опухолей. Блокада PD-1 может быть эффективна в сочетании с иммуногенным средством, например, препаратом злокачественных клеток, очищенными опухолевыми антигенами (включающих в себя рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), антигенпредставляющими клетками, такими как дендритные клетки, несущие ассоциированные с опухолью антигены, клетки, трансфицированные с генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.*, 2004) и/или другим иммунотерапевтическим антителом (например, антителом к CTLA-4, к PD-L1 и/или к LAG-3). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигенов MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF.

Сочетание антител к PD-1 и к CTLA-4 для лечения прогрессирующей меланомы

Учитывая, что иммунологические контрольные точки не представляют собой избыточные и могут ингибировать активацию Т-клеток, пролиферацию и эффекторную функцию в пределах лимфатических узлов и/или опухолевого микроокружения, и на основании доклинических данных того, что комбинация антител к CTLA-4 и к PD-1 характеризовалась сильным противоопухолевым эффектом в мышинных опухолевых моделях, по сравнению с каждым из антител (смотрите патент США 8008449), гипотеза, которая комбинировала блокаду CTLA-4 и PD-1, могла производить большую противоопухолевую активность, чем одиночные средства, была проверена в клиническом исследовании у пациентов с MEL (пример 15).

Хотя не формально сравниваемые в настоящем исследовании одновременный режим ниволумаба/ипилиумаба, который содержал достигнутые ORR, которые превышали

уровня, достигнутые либо с ниволумабом (пример 7), либо с ипилимумабом в одиночку (Hodi *et al.*, 2010). Самое главное, быстрые и глубокие ответы достигались в значительной части получавших лечение пациентов, "глубокий" опухолевый ответ в отношении ответа поврежденных-мишеней характеризовался уменьшением на 80% или более, по сравнению с исходными измерениями с помощью радиографической оценки. В настоящем исследовании большинство исследуемых пациентов, включающих в себя некоторые с большими и громоздкими опухолевыми нагрузками, достигали > 80% регрессии опухоли во время первоначальной оценки опухоли. Особенно впечатляющим было наблюдение, что 31% пациентов с подлежащими оценке реакциями, получавшие одновременную схему лечения (которая содержит (i) режим дозирования для индукции с комбинированным введением антител к PD-1 и к CTLA-4 с последующим введением одного антитела к PD-1 и (ii) режим дозирования для поддержания, включающий менее частое комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4), демонстрировали > 80% регрессии опухоли к 12 неделе. На MTD для одновременной схемы лечения все 9 реагирующих пациентов продемонстрировали > 80% регрессии опухоли с 3 CR. В отличие от этого, в клинической практике на сегодняшний день < 3% пациентов с MEL, получавших ниволумаб или ипилимумаб в дозе 3 мг/кг, достигали CR (пример 7; Hodi *et al.*, 2010). Таким образом, общая активность этой комбинации иммунотерапии на этой предварительной фазе 1 испытания сравнений очень выгодно отличается от других средств, утвержденных или разрабатываемых для прогрессирующей меланомы, включая в себя нацелено воздействующие ингибиторы активированных киназ (Chapman *et al.*, 2011). Дополнительное преимущество такой комбинации представляет собой прочность ответа, как показано в настоящем исследовании, а также долгосрочных испытаниях иммунотерапии с ниволумабом (как описано в настоящем документе) и ипилимумабом (Wolchok *et al.*, 2013d).

Эти первоначальные данные свидетельствуют о том, что быстрые ответы большей величины могут быть достигнуты у пациентов с комбинацией ниволумаба/ипилимумаба, по сравнению с историческим опытом какого-либо одного средства. Ответы были, как правило, прочными и наблюдались даже у пациентов, лечение которых было прекращено досрочно из-за токсичности. Реагирующие пациенты включали в себя тех, которые были с повышенным ЛДГ, заболеванием M1c и громоздкой многофокусной опухолевой нагрузкой. Сходно с предыдущими докладами, касающимися монотерапии с ипилимумабом или ниволумабом, обычные

ORR не могут полностью захватить спектр клинической активности и потенциального преимущества у пациентов, получавших лечение с одновременной схемой лечения ниволумаба/ипилимумаба в том, что ряд пациентов испытывали либо долгосрочный SD, либо нетрадиционные связанные с иммунной системой паттерны ответа. Действительно, даже среди 7 пациентов в одновременной схеме лечения с $SD \geq 24$ недель или $irSD \geq 24$ недель, как лучший ответ, 6 продемонстрировали значимую регрессию опухоли по меньшей мере на 19%, а седьмой пациент характеризовался снижением опухолевой нагрузки после длительного SD. До опыта с блокадой контрольной точки монотерапия поддерживает наблюдение, что некоторые пациенты могут выживать в течение длительных периодов времени с SD в качестве лучшей OR, подтверждая гипотезу, что восстановление равновесной фазы иммунного надзора представляет собой желательный результат (Screiber *et al.*, 2011).

Наблюдение того, что пациенты могут достичь OR, когда последовательно получают ниволумаб после предварительного ипилимумаба указывает на то, что отсутствие реакции на блокаду CTLA-4 не исключает клинический эффект от блокады PD-1 и дополнительно поддерживает статистически неопределенный характер этих совместных путей ингибирования. Примечательно, что описанные в настоящем документе данные (пример 8) указывают на связь между возникновением реакции и экспрессией PD-L1 опухолью у пациентов, получающих ниволумаб, и предыдущие данные свидетельствуют о корреляции между OS и увеличениями в периферическом ALC у пациентов, получавших ипилимумаб (Berman *et al.*, 2009; Ku *et al.*, 2010; Postow *et al.*, 2012; Delyon *et al.*, 2013). В настоящем исследовании комбинации ниволумаба/ипилимумаба клинический ответ наблюдался у пациентов независимо от числа лимфоцитов и базовой экспрессии PD-L1 опухоли (пример 17), предполагая, что иммунный ответ, вызванный комбинированной терапией, характеризуется уникальными особенностями, по сравнению с монотерапией, в то время как данные показывают, что базовая экспрессия PD-L1 опухоли и число лимфоцитов может быть менее актуальным в условиях активной комбинации схем лечения, способной вызывать быструю и отчетливо выраженную регрессию опухоли, также следует отметить, что разные антитела к PD-L1 (кроличье моноклональное антитело 28-8 против мышинового моноклонального антитела 5H1) были использованы в другом анализе ИHC для измерения экспрессии PD-L1 в исследовании комбинированной терапии, по сравнению с исследованием монотерапии с ниволумабом. В дополнение к изменениям в анализе ИHC и антителе, различные результаты могут также отражать

различия в образцах биопсии и неоднородности опухолей. Пригодность экспрессии PD-L1 в качестве биомаркера для эффективности анти-PD-1 будет в дальнейшем оцениваться в перспективе в фазе 3 рандомизированных исследований (смотрите, например, NCT01721772, NCT01668784 и NCT01721746).

Спектр нежелательных явлений, наблюдаемых у пациентов, получавших одновременную схему лечения, был качественно подобен опыту с монотерапией с ниволумабом или ипилимумабом, хотя уровень АЕ был увеличен у пациентов, получавших комбинацию. Степень тяжести 3-4 связанных с лечением АЕ наблюдалась у 53% пациентов, получавших одновременную схему лечения ниволумаба/ипилимумаба, по сравнению с историческими уровнями 20% у пациентов, получавших монотерапию ипилимумаб (Hodi *et al.*, 2010) и 17% у пациентов, получавших только ниволумаб (пример 5) в дозе 3 мг/кг. В когорте последовательной схемы лечения 18% пациентов получили 3-4 степень тяжести связанных с лечением АЕ. АЕ, с которыми сталкивались пациенты с одновременными и последовательными схемами лечения, были управляемыми и/или, как правило, обратимыми, использующими существующие алгоритмы лечения.

В совокупности эти результаты показывают, что ниволумаб и ипилимумаб можно вводить одновременно с управляемым профилем безопасности и приводя к долговечности клинических ответов. Более быстрые и более глубокие клинические опухолевые ответы наблюдались у пациентов, получавших комбинацию, по сравнению с ответами, полученными только с одним средством.

По состоянию на дату прекращения сбора клинических данных, февраль 2013, для исследования, описанного в примере 15, из 52 субъектов на одновременной схеме лечения, анализируемых на ответ, 21 (40%) характеризовались наличием OR по модифицированным критериям Всемирной организации здравоохранения (mWHO) (Wolchok *et al.*, 2009). У дополнительных 2 субъектов (4%) были неподтвержденные OR. В когорте 1 (0,3 мг/кг ниволумаб плюс 3 мг/кг ипилимумаб) 3 из 14 оцениваемых субъектов характеризовались наличием OR по mWHO (ORR: 21%, в том числе 1 CR и 2 PR). В когорте 2 (1 мг/кг ниволумаб плюс 3 мг/кг ипилимумаб) 9 из 17 оцениваемых субъектов характеризовались наличием OR по mWHO (ORR: 53%; в том числе 3 CR и 6 PR). В когорте 2а (3 мг/кг ниволумаб плюс 1 мг/кг ипилимумаб) 6 из 15 оцениваемых субъектов характеризовались наличием OR по mWHO (ORR: 40%; в том числе 1 CR и 5 PR). В когорте 3 (3 мг/кг ниволумаб плюс 3 мг/кг ипилимумаб) 3 из 6 оцениваемых субъектов характеризовались наличием объективного ответа по mWHO

(ORR: 50%, в том числе 3 PR). На основании этих данных раскрытое в настоящем документе изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающему введение субъекту: (а) антитела или его антигенсвязывающего участка, которое специфически связывается с и ингибирует PD-1; и (b) антитела или его антигенсвязывающего участка, которое специфически связывается с и ингибирует CTLA-4; каждое антитело, вводимое в дозе от 0,1 до 20,0 мг/кг массы тела в одновременной схеме лечения, включающей: (i) режим дозирования для индукции, включающий комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования, составляющей по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц для достижения по меньшей мере 2, 4, 6, 8 или 10 доз, с последующим введением только антитела к PD-1 с частотой дозирования, составляющей по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц для достижения по меньшей мере 2, 4, 6, 8 или 12 доз; с последующим (ii) режимом дозирования для поддержания, включающим комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования, составляющей по меньшей мере один раз в 8, 12 или 16 недель или по меньшей мере один раз в квартал для достижения по меньшей мере 4, 6, 8, 10, 12 или 16 доз, или до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не возникает неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания.

Согласно некоторым вариантам осуществления этого способа поддержание режима включает комбинированное введение до 4, 6, 8, 10, 12 или 16 доз антител к PD-1 и к CTLA-4. Согласно другим вариантам осуществления одновременный режим включает: (i) режим дозирования для индукции, включающий комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования один раз в 2, 3 или 4 недели или один раз в месяц для достижения 2, 4, 6 или 8 доз с последующим введением одного антитела к PD-1 с частотой дозирования один раз каждые две, три или четыре недели или один раз в месяц для достижения 2, 4, 6, 8 или 12 доз; затем (ii) режим дозирования для поддержания, включающий комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования один раз в 8, 12 или 16 недель или один раз в квартал для достижения 4, 6, 8, 10, 12 или 16 доз, или до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания. Согласно некоторым другим вариантам осуществления каждое из антител к PD-1 и к CTLA-4 индивидуально вводят в дозе 0,1, 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10 или 20 мг/кг. Согласно дополнительным

вариантам осуществления дозировка каждого из антител к PD-1 и к CTLA-4 остается постоянной во время режима дозирования для индукции и режима дозирования для поддержания. Согласно еще другим вариантам осуществления антитела к PD-1 и к CTLA-4 вводят в следующих дозах: (a) 0,1 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4; (b) 0,3 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4; (c) 1 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4; (d) 3 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4; (e) 5 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4; (f) 10 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4; (g) 0,1 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4; (h) 0,3 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4; (i) 1 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4; (j) 3 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4; (k) 5 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4 или (l) 10 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4.

В протоколе, описанном в примере 15, режим дозирования 3 мг/кг ниволумаба плюс 3 мг/кг ипилимумаба превышал MTD (хотя комбинации с ипилимумабом и другими антителами к PD-1 могут характеризоваться более высоким или более низким MTD), в то время как когорты 2 (ниволумаб в концентрации 1 мг/кг плюс ипилимумаб в концентрации 3 мг/кг), так и когорты 2a (ниволумаб в концентрации 3 мг/кг плюс ипилимумаб в концентрации 1 мг/кг) характеризовались аналогичной клинической активностью. Кроме того, большинство ответов на комбинацию ниволумаба и ипилимумаба происходили в течение первых 12 недель. Учитывая неуверенность в том, способствует ли ипилимумаб, вводимый до 12 недель, клинической эффективности и тот факт, что Администрация США по пищевым продуктам и лекарственным веществам (FDA) - и Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) - утвердили график ипилимумаба каждые 3 недели для достижения в общей сложности четырех доз, согласно предпочтительному варианту осуществления антитело к CTLA-4 вводят во время режима дозирования для индукции один раз в три недели для достижения в общей сложности четырех доз. Было показано, что лечение монотерапией ниволумаба в дозе 3 мг/кг каждые две недели до прогрессирования связано с прочными ответами (примеры 4-7), и было показано, что режим дозирования для поддержания, включающий введение ниволумаба каждые 12 недель, был эффективным (пример 15). Таким образом, начиная с 12 недели, которая следует после завершения четырех доз комбинированных ниволумаба и ипилимумаба, ниволумаб в дозе 3 мг/кг может вводиться через каждые от 2 до по меньшей мере 12 недель до прогрессирования. Соответственно, согласно предпочтительным вариантам

осуществления способа одновременной схемы лечения антитела к PD-1 и к CTLA-4 вводят в дозах: (а) 1 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4 или (б) 3 мг/кг антитела к PD-1 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4, и одновременная схема лечения дополнительно включает: (i) режим дозирования для индукции, включающий комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 при частоте дозирования один раз в три недели для достижения четырех доз с последующим введением одного антитела к PD-1 с частотой дозирования один раз в три недели до достижения четырех доз с последующим (ii) режимом дозирования для поддержания, включающим комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования один раз в 2-12 и более недель до 8 доз, или до тех пор, пока не будет наблюдаться клинический эффект или пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания.

Анализ воздействие-отклик монотерапии ниволумаба в диапазоне доз от 1 мг/кг до 10 мг/кг обнаруживает подобную клиническую активность (пример 7), в то время как анализ воздействие-отклик монотерапии ипилимумаба в дозе 0,3 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг продемонстрировал увеличение активности с увеличением дозы в фазе 2 испытания (Wolchok *et al.*, 2010). Таким образом, доза 3 мг/кг ипилимумаба (когорты 2) может быть более клинически эффективной, чем отбор 3 мг/кг ниволумаба (когорты 2а). Таким образом, согласно более предпочтительным вариантам осуществления способа одновременной схемы лечения, антитела к PD-1 и к CTLA-4 вводят в дозах 1 мг/кг антитела к PD-1 и 3 мг/кг антитела к CTLA-4.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящих способов антитела к PD-1 и к CTLA-4 составляют для внутривенного введения. Согласно некоторым другим вариантам осуществления, когда антитела к PD-1 и к CTLA-4 вводят в комбинации, их вводят в течение 30 минут друг по отношению к другу. Либо антитело может быть введено первым, т.е., согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 вводят перед антителом к CTLA-4, в то время как согласно другим вариантам осуществления антитело к CTLA-4 вводят перед антителом к PD-1. Как правило, каждое антитело вводят внутривенно в течение 60 минут. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитела к PD-1 и к CTLA-4 вводят одновременно, либо в смеси в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом составе для одновременного введения, либо одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом составе.

Данные, описанные в примере 7, показывают, что иммунотерапия с ниволумабом приводила к значительной клинической активности у пациентов с MEL, которые были невосприимчивы к предшествующей терапии с ипилимумабом. Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрен способ последовательной схемы для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, субъекта, который ранее получал антитело к CTLA-4, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего участка, которое специфически связывается и ингибирует PD-1 в диапазоне доз от 0,1 до 20,0 мг/кг массы тела и частотой дозирования по меньшей мере один раз в неделю, по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц до достижения от 6 до 72 доз, или до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления этого способа введение антитела к PD-1 субъекту начинается в течение 1-24 недель после последнего получения антитела к CTLA-4. Согласно другим вариантам осуществления введение антитела к PD-1 субъекту начинается в течение 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 или 24 недель после последнего получения антитела к CTLA-4. Согласно предпочтительным вариантам осуществления введение антитела к PD-1 начинается в течение 4, 8 или 12 недель после последнего получения субъектом антитела к CTLA-4. Некоторые варианты осуществления способа включают введение антитела к PD-1 в дозе 0,1-20 мг/кг, например, 0,1, 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10 или 20 мг/кг. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 вводят в дозе 1 или 3 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательная схема лечения включает введение антитела к PD-1 субъекту с частотой дозирования один раз в неделю, один раз в 2, 3 или 4 недели или раз в месяц до 6 - 72 доз, или до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не происходит неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 вводят в дозе 1 или 3 мг/кг с частотой дозирования один раз в две недели в течение до 48 доз. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 составляют для внутривенного введения.

Согласно некоторым аспектам любого из настоящих способов одновременных или последовательных схем лечение производит по меньшей мере один терапевтический эффект, выбранный из уменьшения размера и/или роста опухоли, устранения опухоли, уменьшение числа метастатических очагов с течением времени, полного

ответа, частичного ответа и стабилизации заболевания. На основе широкого спектра злокачественных опухолей, в которых ниволумаб показал клинический ответ, настоящие способы комбинированной терапии также применимы к различным злокачественным опухолям. Примеры злокачественных опухолей, которые можно лечить с помощью этих способов, включают в себя рак печени, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак легких, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак почки, рак матки, рак яичников, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак семенника, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль оси позвоночника, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, плоскоклеточный рак, вызванный окружающей средой плоскоклеточный рак, включающий в себя вызванный воздействием асбеста, гематологические злокачественные образования, включающие в себя, например, множественную миелому, В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, неходжкинские лимфомы, острую миелоидную лимфому, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому предшественников В-клеток, лимфому клеток мантии, острый лимфобластный лейкоз, грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, Т-клеточную лимфому и лимфобластную лимфому предшественников Т-клеток, а также любые комбинации указанных видов злокачественных опухолей. Настоящее изобретение также применимо к лечению метастатических, устойчивых или повторяющихся злокачественных опухолей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления подвергаемую лечению злокачественную опухоль выбирают из MEL, RCC, плоскоклеточного NSCLC, неплоскоклеточного NSCLC, CRC, CRPC, OV, GC, HCC, PC, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака пищевода, желудочно-кишечного

тракта и молочной железы и гематологических злокачественных новообразований. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой MEL.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект предварительно получал лечение от злокачественной опухоли. Например, пациент мог получать 1 или 2 или более предыдущих системных схем лечения типа, описанного в настоящем документе в качестве стандартных лекарственных средств. Согласно некоторым другим вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой прогрессирующую, повторяющуюся, метастатическую и/или устойчивую злокачественную опухоль. Согласно предпочтительным вариантам осуществления одновременная или последовательная схема лечения индуцирует длительный клинический ответ у субъекта. Согласно предпочтительным вариантам осуществления субъект представляет собой человека, антитело к PD-1 ингибирует PD-1 человека и антитело к CTLA-4 ингибирует CTLA-4 человека.

Используемое в настоящих способах антитело к PD-1 может представлять собой любое терапевтическое антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело, которое может представлять собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 в переменной области тяжелой цепи и домены CDR1, CDR2 и CDR3 в переменной области легкой цепи 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (ниволумаб), 4A11, 7D3 или 5F4, соответственно, как описано и охарактеризовано в патенте США № 8008449. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 содержит переменные области тяжелой и легкой цепей 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (ниволумаб), 4A11, 7D3 или 5F4, соответственно. Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (ниволумаб), 4A11, 7D3 или 5F4. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб.

Антитела к CTLA-4 согласно настоящему изобретению связываются с CTLA-4 человека с тем, чтобы нарушить взаимодействие CTLA-4 с рецептором B7 человека. Поскольку взаимодействие CTLA-4 с B7 преобразует сигнал, ведущий к инактивации Т-клеток, несущих рецептор CTLA-4, нарушение взаимодействия эффективно индуцирует, усиливает или пролонгирует активацию таких Т-клеток, таким образом,

индуцируя, усиливая или продлевая иммунный ответ. Антитела к CTLA-4 описаны, например, в патентах США № 6051227, 7034121, в публикации заявки согласно РСТ № WO 00/37504 и WO 01/14424. Иллюстративное клиническое антитело к CTLA-4 представляет собой человеческое моноклональное антитело 10D1 (теперь известное как ипилимумаб и продаваемое как YERVOY®), как описано в патенте США № 6984720. Согласно некоторым аспектам любого из существующих методов антитело к CTLA-4 представляет собой моноклональное антитело. Согласно некоторым другим вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающий участок в сочетании с антителом к CTLA-4 или его антигенсвязывающим участком для получения совместно вводимого лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, в одновременной схеме лечения, причем антитела к PD-1 и к CTLA-4 каждое вводят в диапазоне доз от 0,1 до 20,0 мг/кг веса тела, и, кроме того, причем одновременная схема лечения включает: (i) режим дозирования для индукции, содержащий комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц для достижения по меньшей мере 2, 4, 6, 8 или 12 доз с последующим введением одного антитела к PD-1 с частотой дозирования по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц для достижения по меньшей мере 2, 4, 6, 8 или 10 доз; с последующим (ii) режимом дозирования для поддержания, включающим комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования по меньшей мере один раз в 8, 12 или 16 недель или по меньшей мере один раз в квартал для достижения 4, 6, 8, 10, 12 или 16 доз, или до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не возникает неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания. В настоящем изобретении предусмотрено использование комбинации антител к PD-1 и к CTLA-4 для подготовки совместно вводимых лекарственных средств, соответствующих всем вариантам осуществления способов лечения, применяющих эти описанные в настоящем документе антитела, и широко применяемых для полного спектра описанных в настоящем документе злокачественных опухолей.

В настоящем изобретении также предусмотрено антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий участок для использования в комбинации с антителом к CTLA-4 или его антигенсвязывающим участком для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, в одновременной схеме лечения, причем антитела к PD-1 и к CTLA-4 каждое вводят в диапазоне доз от 0,1 до 20,0 мг/кг веса тела, и, кроме того, причем одновременная схема лечения включает: (i) режим дозирования для индукции, включающий комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц для достижения по меньшей мере 2, 4, 6, 8 или 12 доз с последующим введением одного антитела к PD-1 с частотой дозирования по меньшей мере один раз в 2, 3 или 4 недели или по меньшей мере один раз в месяц для достижения по меньшей мере 2, 4, 6, 8 или 10 доз; с последующим (ii) режимом дозирования для поддержания, включающим комбинированное введение антител к PD-1 и к CTLA-4 с частотой дозирования по меньшей мере один раз в 8, 12 или 16 недель или по меньшей мере один раз в квартал для достижения 4, 6, 8, 10, 12 или 16 доз, или до тех пор, пока наблюдается клинический эффект или пока не возникает неуправляемая токсичность или прогрессирование заболевания.

Способы для скрининга популяции пациентов и выбора пациента в качестве подходящего для иммунотерапии с комбинацией антител к PD-1 и к CTLA-4 с использованием одновременных или последовательных схем лечения, и способы прогнозирования эффективности комбинации антител, основанные на анализе биомаркера PD-L1 выполняются, как описано для анти-PD-1 монотерапии, в тех случаях, когда этот биомаркер применим к комбинированной терапии с антителами к PD-1 и к CTLA-4.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен набор для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, набор, содержащий: (a) диапазон доз в пределах от 0,1 до 20,0 мг/кг веса тела антитела или его антигенсвязывающего участка, которое специфически связывает и ингибирует PD-1; (b) диапазон доз в пределах от 0,1 до 20,0 мг/кг веса тела антитела или его антигенсвязывающего участка, которое специфически связывает и ингибирует CTLA-4 и (c) инструкции по использованию комбинации антител к PD-1 и к CTLA-4 в любом из способов одновременной схемы лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления некоторые из доз антител к PD-1 и к CTLA-4 смешивают в одном фармацевтическом составе для одновременного введения. Согласно другим вариантам осуществления

дозы антител к PD-1 и к CTLA-4 составляют в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом составе.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен набор для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, набор, содержащий: (а) диапазон доз в пределах от 0,1 до 20,0 мг/кг веса тела антитела или его антигенсвязывающего участка, которое специфически связывает и ингибирует PD-1 и (б) инструкции по использованию антитела к PD-1 в способах одновременной схемы лечения.

Комбинированная блокада PD-1 и CTLA-4 может быть также дополнительно скомбинирована со стандартными способами лечения злокачественных опухолей. Например, комбинированная блокада PD-1 и CTLA-4 может быть эффективна в сочетании с химиотерапевтическими схемами лечения, например, дополнительная комбинация с дакарбазином или IL-2 для лечения MEL. В этих случаях может быть возможным снижение дозы химиотерапевтического реагента. Научное обоснование комбинированного применения блокады PD-1 и CTLA-4 с химиотерапией представляет собой то, что гибель клеток, которая представляет собой следствие цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна привести к повышенным уровням опухолевого антигена в антиген-презентирующем пути. Другие комбинированные препараты, которые могут привести к синергии с комбинированной блокадой PD-1 и CTLA-4 через клеточную гибель включают в себя радиацию, хирургическое вмешательство или гормональную депривацию. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также могут быть объединены с комбинированной блокадой PD-1 и CTLA-4. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые также могут быть источником опухолевого антигена, подаваемого в антиген-презентирующие пути хозяина.

Иммунотерапия пациентов со злокачественной опухолью с использованием антитела к PD-L1

PD-L1 представляет собой основной лиганд PD-1, активируемый в солидных опухолях, где он может ингибировать продукцию цитокинов и цитолитическую активность PD-1-положительных, проникающих в опухоли CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, соответственно (Dong *et al.*, 2002; Hino *et al.*, 2010; Taube *et al.*, 2012). Эти свойства делают PD-L1 перспективной мишенью для иммунотерапии злокачественной опухоли. Клинические испытания анти-PD-L1 иммунотерапии, описанные в примерах, впервые демонстрируют, что блокада моноклональными антителами

иммунного ингибирующего лиганда, PD-L1, производит как прочную регрессию опухоли, так и длительную (≥ 24 недель) стабилизацию заболевания у пациентов с метастатическими NSCLC, MEL, RCC и OV, включающими в себя с интенсивной предшествующей терапией. Человеческое моноклональное антитело к PD-L1, BMS-936559, характеризовалось благоприятным профилем безопасности в целом в дозах до и включая 10 мг/кг, как это видно из низкого количества (9%) случаев связанных с лекарственными средствами АЕ 3-4 степени тяжести. Эти данные согласуются со средним аутоиммунным фенотипом, обнаруженным у PD-L1^{-/-} мышей (Dong *et al.*, 2004) и более серьезной гиперпролиферацией, обнаруженной у CTLA-4^{-/-} мышей, по отношению к PD-L1^{-/-} мышам (Phan *et al.*, 2003; Tivol *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1999). Большинство токсичностей, связанных с введением анти-PD-L1 у пациентов, было связано с иммунной системой, предполагая, воздействие на мишень. Спектр и частота нежелательных явлений, представляющих особый интерес (AEOSI), несколько отличается между анти-PD-L1 и анти-CTLA-4, подчеркивая особую биологию этих путей (Ribas *et al.*, 2005). Реакции инфузии наблюдали с BMS-936559, хотя они были умеренными у большинства пациентов. Тяжелый колит, связанное с лекарственным средством АЕ, наблюдаемое у получавших ипилимумаб пациентов (Beck *et al.*, 2006), не часто отмечалось с анти-PD-L1.

Как отмечалось выше для анти-PD-1 иммунотерапии, другая важная особенность анти-PD-L1 терапии представляет собой долговечность ответов при различных видах опухолей. Это особенно заметно, учитывая прогрессирующее заболевание и предварительное лечение пациентов в текущем исследовании. Хотя это и не сравнивают напрямую, эта продолжительность кажется больше, чем наблюдаемая в большинстве химиотерапий и ингибиторов киназ, используемых для лечения этих злокачественных опухолей.

Поскольку периферические Т-клетки крови экспрессируют PD-L1, возможно оценить RO *in vivo* с помощью BMS-936559 в качестве фармакодинамической меры. Медианная RO составляла 65,8%, 66,2% и 72,4% для испытанных доз. В то время как эти исследования включают прямую оценку и доказательство поражения мишени у пациентов, получавших BMS-936559, отношения между RO в периферической крови и опухолевой микросредой остаются плохо понятыми.

На основании клинических данных, раскрытых в настоящем документе, это изобретение включает способ иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, который включает введение субъекту композиции,

содержащей терапевтически эффективного количества антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего участка. В настоящем изобретении также предусмотрен способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего участка. Согласно предпочтительным вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой изотип IgG1 или IgG4. Согласно другим вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок. Согласно другим вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело или его антигенсвязывающий участок. Согласно предпочтительным вариантам осуществления для лечения пациента-человека антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий участок.

Описанные в примерах клинические испытания использовали человеческое моноклональное антитело к PD-L1 BMS-936559 для лечения злокачественной опухоли. В то время как BMS-936559 (обозначается HuMAb 12A4 в патенте США № 7943743) был выбран в качестве ведущего антитела к PD-L1 для ввода в клинику, следует отметить, что несколько антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению разделяют с 12A4 функциональные свойства, которые имеют важное значение в терапевтической активности 12A4, включающие в себя высокую аффинность связывания, особенно с PD-L1 человека, увеличение пролиферации Т-клеток, секрецию IL-2 и производство γ -интерферона в анализе MLR, ингибируя связывание PD-L1 с PD-1 и обращая супрессирующий эффект Т-регуляторных клеток на эффекторные Т-клетки и/или дендритные клетки. Кроме того, некоторые из антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению, а именно 1B12, 7H1 и 12B7, структурно связаны с 12A4 в содержащих областях V_H и V_K , которые содержат последовательности, полученные из последовательностей 1-69 V_H и L6 V_K зародышевой линии, соответственно. Кроме того, по меньшей мере 12B7, 3G10, 1B12 и 13G4 перекрестно конкурируют с 12A4 за связывание с той же областью эпитопа hPD-L1, в то время как 5F8 и 10A5 могут связываться с такой же или перекрывающейся областью эпитопа 12A4 (примеры 2 и 3). Таким образом,

доклиническая характеристика 12A4 и других человеческих моноклональных антител к PD-L1 показывает, что предусмотренные в настоящем документе способы лечения злокачественной опухоли могут быть выполнены с использованием любого из широкого рода антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы иммунотерапии, включающие введение пациенту антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего участка, содержащего (а) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-18 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 V_K зародышевой линии человека; (b) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-69 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L6 V_K зародышевой линии человека; (с) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-3 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L15 V_K зародышевой линии человека; (d) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 1-69 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности A27 V_K зародышевой линии человека; (е) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-9 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L15 V_K зародышевой линии человека или (f) вариабельную область тяжелой цепи, которая

содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности 3-9 V_H зародышевой линии человека, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, полученной из последовательности L18 V_k зародышевой линии человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления введенное пациенту антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует за связывание с PD-L1 с эталонным антителом или его эталонным антигенсвязывающим участком, содержащим: (a) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25; (b) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26; (c) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 27; (d) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 28; (e) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29; (f) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 20, и

вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30; (g) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 31; (h) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32; (i) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33 или (j) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок перекрестно конкурирует за связывание с PD-1 с эталонным антителом или его эталонным антигенсвязывающим участком, содержащим вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, и вариабельный участок легкой цепи человека, содержащий последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления раскрытых в настоящем документе способов иммунотерапии вводимое субъекту антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий участок содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15, и

[illegible]

характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32; (i) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 33 или (j) вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельную область тяжелой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16, вариабельную область легкой цепи человека, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26.

Широкий спектр злокачественных опухолей, подвергающихся лечению с помощью анти-PD-L1 иммунотерапии

Клиническая активность анти-PD-L1 у пациентов с прогрессирующим NSCLC, схожая с активностью анти-PD-1 у этих пациентов, была удивительной и неожиданной, так как NSCLC считался плохо реагирующим на основанные на иммунной системе терапии (Holt and Disis, 2008; Holt *et al.*, 2011). Настоящие клинические данные, полученные с BMS-936559, антителом к PD-L1 согласно настоящему изобретению, обосновывают и расширяют данные, полученные с использованием антитела к PD-1, что иммунотерапия на основе блокады PD-1 не применяется только к "иммуногенным" типам опухолей, таким как MEL и RCC, но также эффективна в широком диапазоне злокачественных опухолей, включающем в себя устойчивые к лечению метастатические NSCLC, которые обычно не рассматриваются как отвечающие на иммунную систему. Предпочтительные злокачественные опухоли, которые можно лечить с использованием антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению, включают в себя MEL (например, метастатическую злокачественную меланому), RCC, плоскоклеточный NSCLC, неплоскоклеточный NSCLC, CRC, рак яичников (OV), рак желудка (GC), рак молочной железы (BC), карциному

поджелудочной железы (РС) и карциному пищевода. Кроме того, настоящее изобретение включает в себя устойчивые или рецидивирующие злокачественные новообразования, чей рост можно ингибировать с использованием антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению.

Соответственно, примеры злокачественных опухолей, которые можно лечить с использованием антитела к PD-L1 в способах согласно настоящему изобретению на основе показаний очень широкой применимости предусмотренной в настоящем документе анти-PD-L1 иммунотерапии включают в себя рак костей, рак кожи, рак головы или шеи, рак молочной железы, рак легких, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак почки, рак матки, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак семенников, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, карциномы яичников, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак пениса, хронический или острый лейкозы, включающие в себя острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль спинной оси, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, множественную миелому, связанные с окружающей средой злокачественные опухоли, включающие в себя те, которые индуцированы асбестом, метастатические злокачественные опухоли и любые комбинации указанных злокачественных опухолей. Настоящее изобретение также применимо к лечению метастатических злокачественных опухолей.

Комбинированная терапия с антителами к PD-L1

Дополнительно, антитела к PD-L1 могут быть объединены с иммуногенным средством, например, препаратом злокачественных клеток, очищенными опухолевыми антигенами (включающими в себя рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), антиген-презентирующими клетками, такими как дендритные

клетки, несущие ассоциированные с опухолью антигены, клетки, трансфицированные с генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He *et al.*, 2004). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF. Блокада PD-L1 может быть также эффективна в сочетании со стандартными способами лечения злокачественных опухолей, включающими в себя химиотерапевтические схемы лечения, радиацию, хирургию, гормональную депривацию и ингибиторы ангиогенеза, а также другое иммунотерапевтическое антитело (например, антитело к PD-1, к CTLA-4 или к LAG-3).

Использование антител к PD-L1

В настоящем изобретении предусмотрено использование любого антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего участка согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для ингибирования сигналов от пути PD-1/PD-L1 так, чтобы, таким образом, потенцировать эндогенный иммунный ответ у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли. В настоящем изобретении также предусмотрено использование любого антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего участка согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающей нарушение взаимодействия между PD-1 и PD-L1. В настоящем изобретении предусмотрено медицинское применение любого из антител к PD-L1 или его антигенсвязывающему участку согласно настоящему изобретению, соответствующему всем вариантам осуществления способов лечения, использующих, описанное в настоящем документе антитело к PD-L1.

В настоящем изобретении также предусмотрено антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий участок согласно настоящему изобретению для применения в лечении субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающем потенцирование эндогенного иммунного ответа у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, путем ингибирования передачи сигналов от пути PD-1/PD-L1. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрено антитело к PD-L1 или его антигенсвязывающий участок согласно настоящему изобретению для применения в иммунотерапии у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, содержащей нарушение взаимодействия между PD-1 и PD-L1. Эти антитела могут быть

использованы в потенцировании эндогенного иммунного ответа против или в иммунотерапии полного спектра раскрытых в настоящем документе злокачественных опухолей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления злокачественные опухоли включают в себя MEL (например, метастатическую злокачественную меланому), RCC, плоскоклеточный NSCLC, неплоскоклеточный NSCLC, CRC, рак яичников (OV), рак желудка (GC), рак молочной железы (BC), карциному поджелудочной железы (PC) и карциному пищевода.

Проверка иммунотерапии злокачественных опухолей с помощью блокады иммунной контрольной точки

Важная роль клинической активности блокады иммунной контрольной точки заключается в том, что создаются значительные эндогенные иммунные ответы на опухолевые антигены, и эти ответы могут быть использованы в терапевтических целях для опосредования клинической регрессии опухоли через ингибирование контрольной точки. В самом деле, существует доказательство того, что такие ингибирующие лиганды, как PD-L1, индуцируются в ответ на иммунную атаку, механизм, называемый адаптивной устойчивостью (Gajewski *et al.*, 2010; Taube *et al.*, 2012). Этот потенциальный механизм иммунной устойчивости опухолей предполагает, что PD-1/PD-L1-направленная терапия может быть согласована с другими способами лечения, которые повышают эндогенный противоопухолевый иммунитет. Последующие исследования подтвердили, что пациенты продолжают демонстрировать контроль опухоли после отмены блокады пути PD-1/PD-L1 (Lipson *et al.*, 2013). Такой контроль опухоли может отражать постоянный противоопухолевый иммунный ответ и генерацию эффективной иммунологической памяти с тем чтобы, сделать возможным устойчивый контроль роста опухоли.

Описанные в настоящем документе данные клинических испытаний антител, которые блокируют иммунорегуляторный рецептор, PD-1, а также антитела, которые блокируют один из его родственных лигандов, PD-L1, не имеют аналогов. Эти данные представляют собой крупнейший клинический опыт на сегодняшний день с направленной через путь PD-1 иммунотерапией злокачественной опухоли, и первый доклад, специально описывающий безопасность, переносимость и начальную клиническую активность направленного к PD-L1- средства. Эти результаты показывают, что как анти-PD-1, так и анти-PD-L1 характеризуются благоприятными профилями общей безопасности и обеспечивают четкие доказательства клинической активности в различных злокачественных опухолях, включающих в себя NSCLC,

опухоль, которая исторически не рассматривается, как реагирующая на иммунотерапию, а также опухоли, которые, как известно, отвечают на иммунотерапию, включающие в себя MEL, RCC и OV. Таким образом, эти данные прочно проверяют путь PD-1/PD-L1 в качестве важной мишени для терапевтического вмешательства при злокачественной опухоли.

Замечательные сходства, наблюдаемые между паттернами клинической активности, полученными с моноклональными антителами к PD-1 и к PD-L1, и среди типов опухолей, анализируемых на сегодняшний день, проверяют общее значение сигнального пути PD-1/PD-L1 в опухолевой иммунной устойчивости и в качестве мишени для терапевтического вмешательства. Хотя молекулярные взаимодействия, блокируемые этими двумя антителами, не идентичны, было четко показано в настоящем документе, что, независимо от механических деталей, как антитела к PD-1, так и к PD-L1 согласно настоящему изобретению эффективны при лечении пациентов, страдающих от большого разнообразия злокачественных опухолей.

Инфекционные заболевания

Другие способы согласно настоящему изобретению используются для лечения пациентов, которые подвергались воздействию определенных токсинов или патогенов. Например, согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту антитела к PD1 или к PD-L1 или его антигенсвязывающего участка согласно настоящему изобретению таким образом, что субъекта лечат от инфекционного заболевания. Предпочтительно, антитело представляет собой человеческое антитело к PD-1 или PD-L1 человека (например, любое из описанных в настоящем документе человеческих антител). Альтернативно, антитело представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

Сходно с его применением к опухолям, как обсуждалось выше, опосредованная антителом блокада PD-1 или PD-L1 может быть использована отдельно или в качестве адъюванта в сочетании с вакцинами для усиления иммунного ответа на патогены, токсины и/или сами антигены. Примеры патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно полезен, включают в себя патогены, для которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, для которых обычные вакцины менее чем полностью эффективны. Они включают в себя без ограничения ВИЧ, гепатит (А, В, и С), грипп, герпес, лямблии, малярию, лейшманию, золотистый стафилококк, синегнойную палочку. Блокада PD-1 и/или PD-L1 особенно применима

в отношении установленных инфекций патогенами, такими как ВИЧ, которые представляют измененные антигены в течение инфекции. Новые эпитопы на этих антигенах распознаются как чужеродные во время введения PD-1 или PD-L1 к человеку, таким образом, вызывая сильную реакцию Т-клеток, которая не подавляется отрицательными сигналами через путь PD-1/PD-L1.

В указанных выше способах блокада PD-1 или PD-L1 может быть объединена с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, введение интерферонов, GM-CSF, G-CSF или IL-2).

Наборы

Также в объем настоящего изобретения входят наборы, включающие в себя фармацевтические наборы, содержащие антитело к PD-1 и/или к PD-L1 согласно настоящему изобретению или комбинацию антитела к PD-1 и к CTLA-4, для использования в терапевтических целях, а также диагностические наборы, содержащие антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению, для анализа экспрессии мембранного PD-L1 в качестве биомаркера для скрининга пациентов для иммунотерапии или для прогнозирования эффективности иммунотерапевтического средства. Наборы, как правило, включают в себя этикетку, указывающую на предполагаемое использование содержания набора и инструкции по применению. Термин этикетка включает в себя любой написанный или записанный материал, поставляемый на или с набором или который в противном случае входит в комплект поставки набора. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтического набора антитела к PD-1 и/или к PD-L1 могут быть совместно упакованы с другими терапевтическими средствами в стандартной лекарственной форме. Согласно некоторым вариантам осуществления диагностического набора антитела к PD-L1 может быть совместно упаковано с другими реагентами для выполнения анализа для обнаружения и/или количественной оценки экспрессии PD-L1.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления фармацевтический набор содержит человеческое моноклональное антитело к PD-1 человека, ниволумаб. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления фармацевтический набор содержит человеческое моноклональное антитело к PD-L1 человека, BMS-936559. Согласно еще другим предпочтительным вариантам осуществления фармацевтический набор содержит человеческое моноклональное антитело к CTLA-4 человека, ипилиумаб. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления диагностический набор содержит кроличье моноклональное антитело

к PD-L1 человека, 28-8, содержащий области V_H и V_K , чьи аминокислотные последовательности приведены в SEQ ID NO: 35 и 36, соответственно. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления диагностический набор содержит мышинное моноклональное антитело к PD-L1 человека, 5H1 (Dong *et al.*, 2002).

Биомаркер PD-L1 для прогнозирования анти-PD-1 эффективности

Особая проблема в иммунотерапии злокачественных опухолей представляет собой идентификацию основанных на механизме прогностических биомаркеров для того, чтобы сделать возможным выбор пациента и направление на процесс лечения. Описанные в приведенных ниже примерах данные показывают, что экспрессия PD-L1 на клеточной поверхности опухолей представляет собой применимый молекулярный маркер для предсказания эффективности и отбора пациентов для иммунотерапии с анти-PD-1 и, возможно, другими ингибиторами иммунных контрольных точек.

В литературе существуют противоречивые сообщения о клинических последствиях PD-L1, экспрессированных в опухолях. Несколько исследований пришли к выводу, что экспрессия PD-L1 в опухолях коррелирует с плохим прогнозом для пациента. Смотрите, например, Hino *et al.* (2010) (MEL); Hatanishi *et al.* (2007) (OV); Thompson *et al.* (2006) (RCC). Эти данные могут быть рационализированы на том основании, что взаимодействие PD-L1 на опухолевых клетках и PD-1 на Т-клетках помогает отменить иммунные реакции, направленные против опухоли, приводя к иммунному уклонению от опухоли-специфических Т-клеток (Blank *et al.*, 2005). Тем не менее, в отличие от предыдущих исследований, Gadiot с соавт. (2011) и Taube с соавт. (2012) недавно сообщили, что экспрессия PD-L1 в опухолях меланомы коррелирует с тенденцией к лучшей выживаемости. Эти, казалось бы, противоречивые данные могут отражать относительно небольшое число проанализированных пациентов, различные изученные гистологические подтипы или различные использованные методики, например, использование различных антител для окрашивания PD-L1, использование замороженного против заключенного в парафин материала для ИHC и обнаружение мембранного и/или цитоплазматического окрашивания PD-L1. Taube с соавт. (2012) отмечают, что PD-L1 представляет собой трансмембранные молекулы типа I, и предполагают, что в то время как цитоплазматическое наличие PD-L1 может представлять внутриклеточные запасы этого полипептида, которые могут быть развернуты на клеточной поверхности при соответствующей стимуляции, существует экспрессия PD-L1 на клеточной поверхности, которая биологически соответствует

потенциальному биомаркеру для предсказания клинического ответа на блокаду PD-1. Смотрите также, Brahmer с соавт. (2010), которые описывают предварительные доказательства, полученные на небольшом размере выборки из всего 9 пациентов, корреляции между мембранной экспрессией PD-L1 и анти-PD-1 эффективностью. Данные, описанные в приведенных ниже примерах, по использованию мембранной экспрессии PD-L1 в качестве биомаркера для анти-PD-1 эффективности, которая была получена из анализа гораздо большего образца, обосновывают гипотезу, что экспрессия PD-L1 может быть использована в качестве биомаркера для прогнозирования анти-PD-1 клинического ответа и для скрининга пациентов для идентификации подходящих кандидатов для иммунотерапии с антителом к PD-1. Хотя полезность этого биомаркера была продемонстрирована для скрининга пациентов или предсказания клинического ответа на анти-PD-1 иммунотерапию, экспрессия PD-L1 может также быть потенциально применима в более широком смысле в качестве компаньона биомаркера для других типов ингибиторов ингибиторных иммунорегуляторов.

В частности, экспрессию мембранных PD-L1 анализировали с использованием протокола автоматизированного ИНС и кроличьего антитела к hPD-L1. Поразительно, в исходном наборе анализируемых данных (смотрите пример 8) ни один из пациентов с негативными в отношении PD-L1 на клеточной поверхности опухолями (MEL, NSCLC, CRC, RCC и CRPC) не испытывал OR после лечения с антителом к PD-1, ниволумабом. В отличие от этого, экспрессия PD-L1 на клеточной поверхности на опухолевых клетках в биопсии до воздействия может быть связана с повышенной частотой OR среди пациентов, получавших ниволумаб. В то время как экспрессия опухолевыми клетками PD-L1 может быть вызвана конститутивными онкогенными путями, она может также отражать "адаптивную иммунную устойчивость" в ответ на эндогенный противоопухолевый иммунный ответ, часть воспалительной реакции хозяина, которая может оставаться под контролем, если не развязана блокадой пути PD-1/PD-L1 (Taube *et al.*, 2012). Эта новая концепция адаптивной иммунной устойчивости в иммунологии злокачественной опухоли предполагает, что такие ингибирующие лиганды, как PD-L1, индуцируются в ответ на иммунную атаку (Gajewski *et al.*, 2010; Taube *et al.*, 2012). Основное следствие клинической активности блокады иммунной контрольной точки, как описано в настоящем документе, представляет собой то, что возникают значительные эндогенные иммунные ответы на опухолевые антигены, и эти ответы могут быть использованы терапевтически для

опосредования клинической опухолевой регрессии через ингибирование контрольной точки. Этот потенциальный механизм иммунной резистентности опухолями предполагает, что PD-1/PD-L1-направленная терапия может быть согласована с другими способами лечения, которые повышают эндогенный противоопухолевый иммунитет.

Анализ экспрессия PD-L1 на клеточной поверхности с помощью автоматизированной ИНС

Как описано в примерах, способ автоматизированной ИНС был разработан для анализа экспрессии PD-L1 на поверхности клеток в образцах ткани FFPE. В настоящем изобретении предусмотрены способы обнаружения присутствия антигена PD-L1 человека в образце исследуемой ткани или количественного определения содержания антигена PD-L1 человека или доли клеток в образце, которые экспрессируют антиген, эти способы включают контактирование исследуемого образца и образца отрицательного контроля с моноклональным антителом, которое специфически связывается с PD-L1 человека в условиях, позволяющих образование комплекса между антителом или его участком и PD-L1 человека. Предпочтительно, исследуемые и контрольные образцы тканей представляют собой образцы FFPE. Образование комплекса затем обнаруживается, причем разница в образовании комплекса между исследуемым образцом и образцом отрицательного контроля свидетельствует о присутствии антигена PD-L1 человека в образце. Используются различные способы для количественной оценки экспрессии PD-L1.

Согласно конкретному варианту осуществления способ автоматизированной ИНС включает: (a) депарафинизацию и регидратацию срезов ткани, установленные в автостейнер; (b) извлечение антиген с использованием decloaking chamber и буфера с pH 6, нагретого до 110°C в течение 10 мин; (c) помещение реагентов на автостейнер и (d) запуск автостейнера для включения стадий нейтрализации эндогенной пероксидазы в образце ткани; блокирования неспецифических связывающих белки сайтов на слайдах; инкубации слайдов с первичным антителом; инкубации с вторичным блокирующим средством; инкубации с полимером NovoLink; добавления субстрата хромогена и развития; и контрастного окрашивания гематоксилином.

Для оценки экспрессии PD-L1 в образцах опухолевой ткани, патолог изучает ряд с опухолевых клеток мембранными PD-L1⁺ в каждом поле под микроскопом и мысленно оценивает процент клеток, которые позитивные, затем усредняет их для того, чтобы прийти к окончательному проценту. Различные интенсивности

окрашивания определяются как 0/отрицательное, 1+/слабое, 2+/умеренное и 3+/сильное. Как правило, значения процентов сначала присваивают 0 и 3+ участкам, а затем рассматриваются промежуточные интенсивности 1+ и 2+. Для сильно неоднородных тканей образец разделяют на зоны, и каждая зона оценивается отдельно, а затем объединяется в единый набор процентных значений. Процент отрицательных и положительных клеток для различных интенсивностей окрашивания определяется из каждой области, и задается среднее значение для каждой зоны. Итоговое процентное значение дается ткани для каждой категории интенсивности окрашивания: отрицательное, 1+, 2+ и 3+. Сумма всех интенсивностей окрашивания должна быть 100%.

Окрашивание также оценивали в проникающих в опухоли воспалительных клетках, таких как макрофаги и лимфоциты. В большинстве случаев макрофаги служат в качестве внутреннего положительного контроля, поскольку окрашивание наблюдается в большом количестве макрофагов. Хотя и не требуется окрашивание с интенсивностью 3+, отсутствие окрашивания макрофагов должно быть принято во внимание, чтобы исключить любой технический сбой. Макрофаги и лимфоциты оценивают по окрашиванию плазматической мембраны, и только записанные для всех образцов как положительные и отрицательные для каждой категории клеток. Окрашивание также характеризуется в соответствии с внешним/внутренним обозначением опухолевых иммунных клеток. "Внутренние" означают иммунные клетки, которые находятся в пределах опухолевой ткани и/или на границах опухолевой области, не будучи физически интеркалированными среди опухолевых клеток. "Внешние" означают, что нет никакой физической ассоциации с опухолью, иммунные клетки, обнаруженные на периферии, связанные с соединительной или любой связанной соседней тканью.

Согласно некоторым вариантам осуществления этих способов оценок образцы оцениваются двумя специалистами, работающими независимо друг от друга, и баллы затем объединяют. Согласно некоторым другим вариантам осуществления идентификация положительных и отрицательных клеток оценивается с использованием соответствующего программного обеспечения.

Гистологический счет используется как более количественная мера данных ИНС.

Гистологический счет рассчитывается следующим образом:

Гистологический счет = $[(\% \text{ опухолей} \times 1 \text{ (низкая интенсивность)}) + (\% \text{ опухолей} \times 2 \text{ (средняя интенсивность)}) + (\% \text{ опухолей} \times 3 \text{ (высокая интенсивность)})]$

Для определения гистологического счет патолог оценивает процент окрашенных клеток в каждой категории интенсивности в образце. Потому что экспрессия большинства биомаркеров представляет собой гетерогенную, гистологический счет представляет собой верное представление всей экспрессии. Окончательный гистологический счет находится в диапазоне от 0 (отсутствие экспрессии) до 300 (максимум экспрессии).

Альтернативный способ количественного определения экспрессии PD-L1 в исследуемом образце ткани ИНС заключается в определении скорректированной оценки воспаления (AIS), определяемой как оценка плотности воспаления, умноженная на процент экспрессии PD-L1 проникающими в опухоль воспалительными клетками (Taube *et al.*, 2012).

Иммунотерапии злокачественной опухоли с анти-PD-1, содержащей стадию отбора пациентов

В настоящем изобретении также предусмотрен способ для иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (a) выбор субъекта, который представляет собой подходящего кандидата для иммунотерапии, например, введения антитела к PD-1, выбор, включающий (i) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, образец исследуемой ткани, содержащей опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, (ii) оценку доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, и (iii) выбор субъекта в качестве подходящего кандидата на основе оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает заданный пороговый уровень; и (b) введение выбранному субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства, которое ингибирует передачу сигнала от ингибиторного иммунорегулятора, например, антитела к PD-1.

Существует доказательство того, что экспрессия мембранных PD-L1 представляет собой заменитель эндогенного противоопухолевого иммунного ответа, который представляет собой часть воспалительной реакции хозяина (Gajewski *et al.*, 2010; Taube *et al.*, 2012). Соответственно, экспрессия PD-L1 на клеточной поверхности в опухолях и/или воспалительных клетках в опухолевом микроокружении может быть маркером не только для выбора пациентов со злокачественной опухолью, которые будут получать выгоду от лечения с антителом к PD-1, но также и для лечения с

антителом к PD-L1, а также воздействия нацеливающих ингибирующих иммунорегуляторных путей, отличных от пути PD-1/PD-L1. Например, экспрессия на клеточной поверхности PD-L1 в опухолях и/или проникающих в опухоль воспалительных клетках может быть использована в качестве маркера для идентификации или выбора подходящих пациентов со злокачественной опухолью, которые будут получать пользу от иммунотерапии со средствами, включающими в себя антитела, которые нацеленно воздействуют и нарушают или ингибируют передачу сигналов от иммунных контрольных точек, таких как PD-L1, антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенуатор В и Т лимфоцитов (BTLA), домен-3 муцина и иммуноглобулина Т-клеток (TIM-3), ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3), киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор (KIR), лектин-подобный рецептор G1 клеток-киллеров (KLRG-1), клеточный рецептор 2B4 натуральных киллеров (CD244) и CD160 (Pardoll, 2012; Baitsch et al., 2012). Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления ингибиторный иммунорегулятор представляет собой компонент сигнального пути PD-1/PD-L1. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления ингибиторный иммунорегулятор представляет собой антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления ингибиторный иммунорегулятор представляет собой антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению.

Если какие-либо способы иммунотерапии, включающие анализ экспрессии PD-L1, т.е., использующие биомаркер экспрессии PD-L1, описаны ниже как включающие выбор пациента, который представляет собой или не представляет собой подходящего для анти-PD-1 иммунотерапии или как включающие введение антитела к PD-1 для целей иммунотерапии, следует понимать, что эти способы применяются в более широком смысле к выбору пациента, который представляет собой или не представляет собой подходящего для иммунотерапии или для введения ингибитора ингибиторного иммунорегулятора (например, CTLA-4, BTLA, TIM3, LAG3 или KIR) или их компонента или лиганда. Кроме того, в любом из способов, включающих измерение экспрессии PD-L1 в исследуемом образце ткани, следует понимать, что стадия, включающая обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента, представляет собой необязательную стадию. Т.е., согласно некоторым вариантам осуществления способ включает в себя эту стадию и согласно другим вариантам осуществления эта стадия не включена в способ. Следует также понимать,

что согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления стадия "оценки" для идентификации или определения количества или части клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности выполняется с помощью преобразующего способа анализа экспрессии PD-L1, например, путем выполнения полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) или анализа ИНС. Согласно некоторым другим вариантам осуществления преобразовательная стадия не участвует и экспрессия PD-L1 оценивается, например, путем обзора отчета о результатах испытаний из лаборатории. Согласно некоторым вариантам осуществления стадии способов до и включая в себя оценку экспрессии PD-L1 обеспечивают промежуточный результат, который может быть предоставлен врачом или другим медицинским работником для использования при выборе подходящего кандидата для иммунотерапии и/или введения иммунотерапевтического средства пациенту. Согласно некоторым вариантам осуществления стадии, которые обеспечивают промежуточный результат, могут быть выполнены врачом или лицом, действующим под руководством врача. Согласно другим вариантам осуществления эти стадии выполняются в независимой лаборатории или независимым лицом, таким как лаборант.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (а) выбор субъекта, который не подходит для лечения со средством, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, иммунотерапия с антителом к PD-1, выбор, включающий (i) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, образец исследуемой ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, (ii) оценку доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, и (iii) выбор субъекта в качестве не подходящего для иммунотерапии с ингибитором ингибиторного иммунорегулятора, например антитела к PD-1, на основе оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, меньше, чем заданный пороговый уровень; и (b) введение стандартного лекарственного средства, отличного от ингибитора ингибиторного иммунорегулятора, например, антитела к PD-1, выбранному субъекту.

Измерение экспрессии PD-L1

Согласно некоторым вариантам осуществления любого из существующих способов доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 оценивают путем выполнения анализа для определения наличия РНК PD-L1. Согласно другим вариантам осуществления наличие РНК PD-L1 определяется с помощью ОТ-ПЦР, гибридизации *in situ* или защиты РНКазы. Согласно другим вариантам осуществления соотношение клеток, которые экспрессируют PD-L1, оценивают путем выполнения анализа для определения наличия полипептида PD-L1. Согласно дополнительным вариантам осуществления наличие полипептида PD-L1 определяется с помощью иммуногистохимии (ИНС), иммуноферментного анализа (ELISA), визуализации *in vivo* или проточной цитометрии. Согласно предпочтительным вариантам осуществления экспрессию PD-L1 анализировали с помощью ИНС. Проточная цитометрия может быть особенно подходящей для анализа экспрессии PD-L1 в клетках гематологических опухолей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления всех этих способов экспрессию PD-L1 на клеточной поверхности анализировали с использованием, например, ИНС или визуализации *in vivo*.

Способы визуализации позволили обеспечить важные инструменты в области научных исследований и лечения злокачественных опухолей. Последние открытия в системах молекулярной визуализации, включающей в себя позитронно-эмиссионную томографию (PET), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT), визуализацию флуоресценцией отражения (FRI), опосредованную флуоресценцией томографию (FMT), биoluminesцентную визуализацию (BLI), лазерную сканирующую конфокальную микроскопию (LSCM) и многофотонную микроскопию (MPM), скорее всего, будут предвещать даже более широкое использование этих техник в исследовании злокачественных опухолей. Некоторые из этих систем молекулярной визуализации позволяют врачам не только увидеть, где опухоль находится в организме, но и визуализировать экспрессию и активность специфических молекул, клеток и биологических процессов, которые влияют на поведение и/или реакцию опухоли на терапевтические лекарственные средства (Condeelis and Weissleder, 2010). Специфичность к антителам в сочетании с чувствительностью и разрешением PET делает визуализацию immunoPET особенно привлекательным для мониторинга и анализа экспрессии антигенов в образцах тканей (McCabe and Wu, 2010; Olafsen *et al.*, 2010). Согласно некоторым вариантам осуществления любого из существующих способов экспрессию PD-L1 анализируют с помощью визуализации immunoPET.

Согласно некоторым вариантам осуществления любого из существующих способов доля клеток в образце исследуемой ткани, которая экспрессирует PD-L1 оценивают путем выполнения анализа для определения наличия полипептида PD-L1 на поверхности клеток в исследуемом образце ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления исследуемый образец ткани представляет собой образец ткани FFPE. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления наличие полипептида PD-L1 определяется с помощью анализа ИНС. Согласно дополнительным вариантам осуществления анализ ИНС осуществляется с использованием автоматизированного процесса. Согласно дополнительным вариантам осуществления анализ ИНС выполняется с использованием моноклонального антитела к PD-L1 для связывания с полипептидом PD-L1.

Антитела, которые специфически связываются с экспрессированными на клеточной поверхности PD-L1 в тканях FFPE

Антитело может связываться с антигеном в свежих тканях, но полностью не узнает антиген в образце FFPE ткани. Это явление, хорошо известное в настоящей области техники, как полагают, обусловлено главным образом внутри- и межмолекулярным сшиванием полипептидов, индуцированное фиксацией формалином, которая изменяет эпитоп, распознаваемый антителом (Sompuram *et al.*, 2006). Кроме того, несколько факторов, как известно, влияют на окрашивание FFPE ткани, в том числе переменное время фиксации, недостаточный период фиксации, различия в используемых фиксаторах, обработке ткани, клоне антитела и разбавлении, поиск антигена, системы обнаружения и интерпретации результатов, использующих различные пороговые точки представляют собой важные переменные, которые могут повлиять на антигенность ткани и измерения ИНС (Bordeaux *et al.*, 2010). В частности, отсутствие антител к PD-L1 человека, которые окрашивают PD-L1 в FFPE образцах, было отмечено в настоящей области техники (Hamanishi *et al.*, 2007). Taube с соавт. (2012) и Gadiot с соавт. (2011) также сообщили о трудностях в идентификации антител к PD-L1, которые специфически связываются с PD-L1 в FFPE тканях, и о непредсказуемых результатах исследований на этих же антителах. Собственный анализ авторов настоящего изобретения пяти серийно выпускаемых антител к HPD-L1 показывает, что эти антитела не различают FFPE клетки, экспрессирующие PD-L1 от клеток, которые не экспрессируют PD-L1 (пример 9, таблица 7). Таким образом, противоречивые результаты, представленные различными группами по сложностям экспрессии PD-L1 для прогнозирования опухоли могут, в частности, отражать

дифференциальные способности антител к PD-L1, используемые для обнаружения полипептида PD-L1 в образцах тканей FFPE. Соответственно, для того, чтобы обнаружить hPD-L1 на клеточной поверхности с использованием анализа ИНС на FFPE тканях, существует потребность в антителах к hPD-L1, которые специфически связываются с экспрессированными на клеточной поверхности PD-L1 в образцах тканей FFPE.

В настоящем изобретении предусмотрено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с экспрессированным на клеточной поверхности антигеном PD-L1 в образце FFPE ткани. Согласно предпочтительным вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок не связывается с цитоплазматическим полипептидом PD-L1 в образце ткани FFPE или проявляет очень низкий уровень фонового связывания. Согласно некоторым другим вариантам осуществления наличие или отсутствие специфического связывания с экспрессированным на клеточной поверхности или цитоплазматическим полипептидом PD-L1 обнаруживается с помощью иммуногистохимического окрашивания. Согласно некоторым предпочтительным аспектам настоящего изобретения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок представляет собой кроличье антитело или его участок. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления моноклональное антитело представляет собой кроличье моноклональное антитело, обозначенное 28-8, 28-1, 28-12, 29-8 или 20-12. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления моноклональное антитело представляет собой кроличье моноклональное антитело, обозначенное 28-8 или его антигенсвязывающий участок. Согласно другим вариантам осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36. Согласно другим вариантам осуществления моноклональное антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 в V_H , характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 в V_L , характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36.

В настоящей области техники известно, что кроличьи антитела характеризуются определенными преимуществами, по сравнению с мышинными антителами. Например, кроличьи антитела, как правило, проявляют более разнообразное узнавание эпитопов, улучшенный иммунный ответ на небольшие эпитопы и более высокую специфичность и аффинность, по сравнению с мышинными антителами (смотрите, например, Fischer *et al.*, 2008; Cheang *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2005). Например, кроличье более низкое иммунное доминирование и больший репертуар В-клеток приводят к большему распознаванию эпитопов, по сравнению с мышинными антителами. Кроме того, высокая специфичность и распознавание новых эпитопов кроличьими антителами приводит к успеху с распознаванием посттрансляционных модификаций (Epitomics, 2013). Кроме того, многие белковые мишени, относящиеся к передаче сигнала и заболеванию, представляют собой высоко консервативные между мышами, крысами и человеком, и, следовательно, могут быть распознаны в качестве аутоантигенов мышью или крысой хозяином, что делает их менее иммуногенными. Эту проблему избегают созданием антител у кроликов. Кроме того, в приложениях, в которых требуются два антиген-специфических антитела, удобнее работать с антителами, поступающими от двух разных видов. Так, например, легче для мультиплексирования кроличье антитело, такое как 28-8 с другим антителом (скорее всего, мышинным антителом, поскольку лучшие иммунные маркерные антитела представляют собой мышинные антитела), которые могут отмечать иммунные клетки, которые также экспрессируют PD-L1 (например, макрофаги и лимфоциты). Соответственно, кроличьи моноклональные антитела к hPD-L1, например, 28-8, особенно подходят для анализов ИНС для определения экспрессированного на поверхности PD-L1 в образцах тканей FFPE и потенциально характеризуются различными преимуществами, по сравнению с мышинными антителами, такими как 5H1.

Как описано в примере 9, большое количество (185) множественных клонов антител как от кроличьей, так и мышинной иммунизации подвергали скринингу, и только десять кроличьих множественных клонов антител, но ни один мышинный множественный клон антитела специфически не обнаруживал мембранную форму hPD-L1. После дальнейшего экстенсивного скрининга с помощью нескольких кругов ИНС, 15 очищенных кроличьих субклонов отбирали на основе их специфичности и интенсивности окрашивания (смотрите таблицу 5). После дальнейшей характеристики антител для определения их аффинности связывания и перекрестной конкуренции с

помощью поверхностного плазмонного резонанса, а также скрининга с помощью ИНС на тканях FFPE, моноклональное антитело 28-8 было выбрано в качестве антитела с наилучшим сочетанием связывания с мембранным PD-L1 с высокой аффинностью и специфичностью и низким фоновым окрашиванием.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок перекрестно конкурирует с мышинным моноклональным антителом 5H1 за связывание с PD-L1, что указывает на то, что эти антитела связываются с той же областью эпитопа PD-L1. Согласно некоторым другим аспектам моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок перекрестно не конкурирует с мышинным моноклональным антителом 5H1 за связывание с PD-L1, указывая на то, что они не связываются с той же областью эпитопа PD-L1.

В настоящем изобретении также предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие все кроличьи антитела к hPD-L1 или их участки, раскрытые в настоящем документе.

Иммунотерапевтические способы, включающие измерение экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности

Доступность кроличьих антител, которые связываются с высокой аффинностью специфически с мембранными PD-L1 в образцах тканей FFPE облегчает способы, включающие стадию обнаружения полипептида PD-L1 на поверхности клеток в образцах ткани FFPE. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрен способ для иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, при этом способ включает: (a) выбор субъекта, который представляет собой подходящего кандидата для иммунотерапии, выбор, включающий: (i) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани FFPE, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (ii) оценку доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности с помощью ИНС с использованием кроличьего антитела к PD-L1 человека, например, моноклонального антитела 28-8, связываться с PD-L1; и (iii) выбор субъекта в качестве подходящего кандидата на основе оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности превышает заданный пороговый уровень; и (b) введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, выбранному субъекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, использующих ИНС для анализа экспрессии PD-L1 в тканях FFPE, используют автоматизированный ИНС анализ. Автоматизированный процесс ИНС осуществляется на автостейнере и содержит: (a) депарафинизацию образца FFPE с ксилолом и регидратацию образца; (b) получение антигена с использованием decloaking chamber; (c) блокирование неспецифических белковых сайтов связывания путем инкубации с белковым блоком; (d) инкубирование образца с первичным антителом к PD-L1; (e) добавление полимерного конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) вторичного антитела; (f) определение связанного вторичного антитела, содержащего окрашивание с хромогеном 3,3'-диаминобензидина (DAB); и/или (g) контрастное окрашивание гематоксилином. Этот автоматизированный процесс ИНС был оптимизирован за счет минимизации количества стадий, оптимизации времени инкубации и выбора первичных антител, блокирования и обнаружения реагентов, которые производят сильное специфическое окрашивание с низким уровнем фонового окрашивания. Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего автоматизированного ИНС анализа первичное антитело к PD-L1 представляет собой кроличье моноклональное антитело 28-8 или мышьеинное моноклональное антитело 5H1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения этот анализ ИНС и любой другой описанный в настоящем документе анализ ИНС для измерения экспрессии PD-L1, может быть использован как часть способа иммунотерапии. Согласно другим вариантам осуществления любой из описанных в настоящем документе способов ИНС используется независимо от любого терапевтического процесса, требующего введения терапевтического средства, т.е. исключительно в качестве диагностического способа для анализа экспрессии PD-L1.

Согласно некоторым вариантам осуществления любого из описанных в настоящем документе способов иммунотерапии вводимое выбранному субъекту антитело представляет собой любое антитело к PD-1 или к PD-L1 или его антигенсвязывающий участок согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий участок. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб и антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559. Согласно некоторым другим вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой антитело или

его антигенсвязывающий участок, который перекрестно конкурирует с ниволумабом за связывание с PD-1, и антитело к PD-L1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий участок, который перекрестно конкурирует с BMS-936559 для связывания с PD-L1. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления подлежащую лечению злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из MEL, RCC, плоскоклеточного NSCLC, неплоскоклеточного NSCLC, CRC, кастрационно-резистентного рака предстательной железы CRPC, НСР, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карциномы пищевода, яичников, желудочно-кишечного тракта и молочной железы и гематологических злокачественных новообразований.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанных способов, заданное пороговое значение основано на доле (а) опухолевых клеток, (b) проникающих в опухоль воспалительных клеток, (с) определенных проникающих в опухоль воспалительных клеток, например, ТИЛ или макрофагов, или (d) комбинации опухолевых клеток и проникающих в опухоль воспалительных клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 0,001% опухолевых клеток, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно другим вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 0,01%, предпочтительно по меньшей мере 0,1%, более предпочтительно по меньшей мере 1% опухолевых клеток, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно некоторым вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 5% опухолевых клеток, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно некоторым вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 0,01%, по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 5% опухолевых клеток, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС и/или единственную проникающую в опухоль воспалительную клетку, экспрессирующую мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно некоторым другим вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 0,01%, по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 5% проникающих в опухоль воспалительных клеток, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно некоторым другим вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 0,01%, по меньшей мере

0,1%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 5% проникающих в опухоль лимфоцитов, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно некоторым другим вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере 0,01%, по меньшей мере 0,1%, по меньшей мере 1% или по меньшей мере 5% проникающих в опухоль макрофагов, экспрессирующих мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Согласно еще другим вариантам осуществления заданный порог составляет по меньшей мере единственную опухолевую клетку или единственную проникающих в опухоль воспалительную клетку, экспрессирующую мембранные PD-L1, как определено с помощью ИНС. Предпочтительно, экспрессию PD-L1 анализировали с помощью автоматизированной ИНС с использованием моноклонального антитела 28-8 или 5H1 в качестве первичного антитела.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (а) скрининг множества субъектов для идентификации субъекта, который представляет собой не подходящего кандидата для иммунотерапии, включающей введение средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, субъекту, скрининг, включающий: (i) необязательное обеспечение исследуемых образцов тканей от множества субъектов, исследуемые образцы тканей, содержащие опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (ii) оценку доли клеток в исследуемых образцах тканей, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; и (iii) выбор субъекта в качестве кандидата, который не подходит для иммунотерапии, основанный на оценке того, что доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности в исследуемом образце ткани субъекта ниже заданного порогового уровня; и (b) введение стандартных лекарственных средств отличных от средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, выбранному субъекту.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (а) скрининг множества субъектов для идентификации субъекта, который представляет собой подходящего кандидата для иммунотерапии, скрининг, включающий: (i) необязательное обеспечение исследуемых образцов тканей от множества субъектов, исследуемые образцы тканей, содержащие опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (ii) оценку доли клеток в исследуемых образцах тканей, которые экспрессируют PD-L1 на поверхности клеток; и (iii) выбор субъекта в

качестве кандидата, который подходит для иммунотерапии со средством, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антителом к PD-L1, основанный на оценке того, что доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности в образце исследуемой ткани субъекта превышает заданный пороговый уровень; и (b) введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество указанного средства выбранному субъекту.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (a) скрининг множества субъектов для идентификации субъекта, который представляет собой подходящего кандидата для лечения, скрининг, включающий: (i) необязательное обеспечение исследуемых образцов тканей от множества субъектов, исследуемые образцы тканей, содержащие опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (ii) оценку доли клеток в исследуемых образцах тканей, которые экспрессируют PD-L1 на поверхности клеток, причем субъекта идентифицируют как подходящего кандидата для иммунотерапии с антителом к PD-1, если доля клеток в образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает заданный пороговый уровень, и субъекта идентифицируют в качестве кандидата, который представляет собой не подходящего кандидата для иммунотерапии с антителом к PD-1, если доля клеток в образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, ниже заданного порогового уровня; и (b) введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, субъекту, идентифицированному в качестве подходящего кандидата для иммунотерапии с антителом к PD-1, или (c) введение стандартного лекарственного средства, отличного от указанного средства, идентифицированному в качестве не подходящего кандидата для иммунотерапии с антителом к PD-1.

Один аспект настоящего изобретения представляет собой способ для иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, при этом способ включает: (a) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) определение того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, выше заданного порогового уровня; и (c) на основе этого определения введение композиции, содержащей терапевтически

эффективное количество средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, субъекту. Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (а) необязательное получение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) определение того, что часть клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, ниже заданного порогового уровня; и (с) на основе этого определения введение стандартного лекарственного средства, отличного от средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, выбранному субъекту.

Еще один аспект настоящего изобретения представляет собой способ для иммунотерапии субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, при этом способ включает: (а) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) определение доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (с) выбор средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, в качестве лечения для субъекта, основываясь на том, что антитело к PD-1 эффективно у пациентов, чей образец исследуемой ткани содержит долю клеток выше заданного порогового уровня, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; и (d) введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество указанного средства субъекту. Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, при этом способ включает: (а) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) определение доли клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (с) отбор стандартного лекарственного средства, отличного от средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитела к PD-1, в качестве лечения для пациента, основываясь на признании того, что указанное средство неэффективно у

пациентов, у которых доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на поверхности клеток в исследуемом образце ткани, ниже заданного порогового уровня; и (d) введение стандартного лекарственного средства субъекту.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ выбора иммунотерапии для субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (a) анализ клеток в исследуемом образце ткани, содержащем опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, чтобы оценить долю клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1; и (b) на основе оценки того, что часть клеток, которые экспрессируют мембранные PD-L1, выше заданного порогового уровня, выбор иммунотерапии, содержащей терапевтически эффективное количество средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, для субъекта. Изобретение дополнительно включает способ выбора лечения для субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий: (a) анализ клеток в исследуемом образце ткани, содержащем опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки, чтобы оценить долю клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют PD-L1; и (b) на основе оценки того, что часть клеток, которые экспрессируют мембранные PD-L1, ниже заданного порогового уровня, выбор стандартного лекарственного средства, отличного от средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, для субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, субъект был отобран на основании того, что доля клеток в исследуемом образце ткани от субъекта, которые экспрессируют PD-L1, определяется как превышающая заданный пороговый уровень, причем исследуемый образец ткани содержит опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительных клеток. В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, включающий введение субъекту стандартного лекарственного средства, отличного от средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, субъект был отобран на основании того, что доля клеток в исследуемом образце ткани от субъекта, которые экспрессируют PD-L1, определяется как ниже заданного

порогового уровня, причем исследуемый образец ткани содержит опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительных клеток.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ для выбора пациента со злокачественной опухолью для иммунотерапии со средством, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, включающий: (a) необязательное получение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) анализ исследуемого образца ткани для определения в нем доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (c) сравнение доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, с заданной пороговой долей; и (d) выбор пациента для иммунотерапии на основании оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани, которые экспрессируют поверхностные PD-L1, выше заданного порогового уровня.

В любом из описанных в настоящем документе способов, включающих стадию оценки экспрессии PD-L1, исследуемый образец ткани может представлять собой образец ткани FFPE, и полипептид PD-L1 на поверхности клеток обнаруживается с помощью ИHC с использованием антитела к PD-L1, например моноклонального антитела 28-8 или 5H1.

Кроме того, в любом способе, в котором иммунотерапию выбирают или вводят на основании оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани от субъекта экспрессирует PD-L1 на уровне выше заданного порогового уровня, следует, что может быть выполнен дополнительный способ лечения, в котором стандартное лечение, отличное от иммунотерапии, выбирают или вводят на основании оценки того, что доля клеток в исследуемом образце ткани от субъекта экспрессирует PD-L1 на уровне ниже заданного порогового уровня.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ для прогнозирования терапевтической эффективности средства, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, для лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий: (a) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) анализ исследуемого образца ткани для определения в нем доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной

поверхности; (с) сравнение доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, с заданным пороговым значением и (d) прогнозирование терапевтической эффективности указанного средства, причем, если доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает пороговую долю, то средство по прогнозам будет эффективным в лечении пациента, и причем, если доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, ниже пороговой доли, то средство по прогнозам не будет эффективным при лечении пациента.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ для определения иммунотерапевтической схемы лечения, содержащей средство, которое ингибирует ингибиторный иммунорегулятор, например, антитело к PD-1, для лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий: (a) необязательное обеспечение исследуемого образца ткани, полученного от пациента со злокачественной опухолью ткани, исследуемый образец ткани, содержащий опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки; (b) анализ исследуемого образца ткани для определения в нем доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности; (с) сравнение доли клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, с заданным пороговым значением и (d) определение иммунотерапевтической схемы лечения, содержащей указанное средство на основании определения того, что доля клеток, которые экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности, превышает заданную пороговую долю.

Стандартные лекарственные средства

Некоторые из описанных в настоящем документе способов лечения включают введение стандартного лекарственного средства пациенту. Используемое в настоящем документе "терапевтическое средство стандартного лечения" представляет собой процесс лечения, включающее в себя лекарственное средство или комбинацию лекарственных средств, лучевой терапии (РТ), хирургии или другого медицинского вмешательства, которое признано врачами как необходимое, принятое и/или широко используемое для определенного типа пациента, заболевания или клинического обстоятельства. Стандартные терапии для различных типов злокачественных опухолей хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Например, Национальная всеобщая онкологическая сеть (NCCN), союз 21 крупного онкологического центра в США, публикует руководство по клинической практике в онкологии NCCN (NCCN GUIDELINES®), которое обеспечивает подробную

информацию на сегодняшний день по терапевтическим средствам стандартного лечения для широкого спектра злокачественных опухолей (смотрите NCCN GUIDELINES®, 2013). В качестве примера, стандартное лечение MEL, RCC и NSCLC приведено ниже.

Меланома

MEL представляет собой злокачественную опухоль меланоцитов, меланин-продуцирующих клеток, находящихся преимущественно в коже. Хотя реже встречающийся, чем другие виды рака кожи, он представляет собой самый опасный из злокачественных опухолей кожи, если не диагностирован на ранней стадии, и вызывает большинство (75%) случаев смерти от рака кожи. Заболеваемость MEL растет во всем мире в кавказских популяциях, особенно там, где народы с низким содержанием пигментации кожи получают чрезмерное воздействие ультрафиолетовым светом от солнца. В Европе показатель заболеваемости составляет <10-20 на 100000 населения; в США 20-30 на 100000 и в Австралии, где наблюдается самый высокий уровень заболеваемости, 50-60 на 100000 (Garbe *et al.*, 2012). На MEL приходится приблизительно 5% всех новых случаев злокачественных опухолей в Соединенных Штатах Америки (США), и заболеваемость продолжает расти почти на 3% в год. Это приводит к 76690 новым случаям в США в 2013 году с 9480, связанными со смертельным исходом (Siegel *et al.* (2013)).

Для *in situ* (стадия 0) или ранней стадии MEL (стадии I-II) хирургическое иссечение представляет собой первичное лечение. В целом, прогноз представляет собой отличный для пациентов с локализованным заболеванием и опухолями, составляющими 1,0 мм или менее в толщину, с 5-летней выживаемостью, составляющей более чем 90% (NCCN GUIDELINES®, 2013 - меланома). Где хирургическое иссечение не представляется возможным для *in situ* меланомы из-за сопутствующих заболеваний или косметически чувствительной локализации опухоли, местный имиквимод и лучевая терапия представляют собой лечение, особенно для меланомы типа злокачественного лентиго. Химиотерапевтические средства для лечения MEL включают в себя дакарбазин, темозоломид и иматиниб для меланомы с мутацией с-KIT, высокие дозы интерлейкина-2 и паклитаксел с или без карбоплатины. Тем не менее, эти процедуры имеют слабый успех с показателем отклика ниже 20% в ситуации первой линии (1L) и второй линии (2L).

Для пациентов с локализованными меланомами больше, чем 1,0 мм в толщину, выживаемость колеблется от 50-90%. Вероятность вовлечения региональных

лимфоузлов увеличивается с увеличением толщины опухоли. Со стадией III MEL (клинически позитивные узлы и/или заболевание в переходной стадии) 5-летняя выживаемость колеблется от 20-70%. До сих пор самая смертоносная представляет собой стадия IV MEL, где долгосрочная выживаемость пациентов с отдаленными метастазами меланомы составляет менее 10% (NCCN GUIDELINES®, 2013 - меланома).

Не существует единого мнения относительно лучшего лечения метастатической MEL, хотя выбор процедур, включающих в себя удаление для очистки края, внутриочаговые инъекции, лазерную абляцию, радиацию и биохимиотерапию (сочетание химиотерапии и биологических средств, таких как интерферон-альфа и IL-2) продолжает исследоваться. В терапевтической перспективе метастатического MEL в последнее время наблюдается значительное улучшение с развитием новых лекарственных средств, таких как вемурафениб и ипилимумаб. Вемурафениб специфически ингибирует передачу сигналов с помощью мутантной внутриклеточной киназы, BRAF, которая присутствует у приблизительно 50% пациентов с метастатической MEL. В клинических испытаниях вемурафениб доставлял по оценкам выживаемости без прогрессирования (PFS) 5,3 месяцев у позитивных по BRAF мутации пациентов, по сравнению с приблизительно 1,6 месяцами для дакарбазина, и медианная OS составляла 15,9 месяцев для вемурафениба, по сравнению с 5,6-7,8 месяцами для дакарбазина (Chapman *et al.*, 2011; Sosman *et al.*, 2012). Ипилимумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое ингибирует рецептор иммунной контрольной точки, CTLA-4, и, таким образом, стимулирует иммунный ответ Т-клеток. Ипилимумаб, с или без пептидной вакцины гликопротеина 100 (gp100), улучшал медианную OS у пациентов с метастатической MEL с предварительным лечением до 10,0-10,1 месяцев, по сравнению с 6,4 месяцами среди пациентов, получавших только gp100 (Hodi *et al.*, 2010). Помимо этих двух средств, ни одно другое средство не продемонстрировало преимущества OS в фазе 3 рандомизированного исследования. Дакарбазин утвержден FDA и EMA для лечения метастатического MEL с сообщенной частота объективного ответа, равной 5-20%, и медианной OS, составляющей приблизительно 6,4 месяцев, но эти ответы недолговечны. Другие лекарственные средства, такие как темозоломид и фотемустин, не привели к значительному повышению выживаемости, по сравнению с дакарбазином. IL-2 также был одобрен FDA для лечения метастатической MEL, поскольку он связан с частотой ответа, равной 15-20%, включая 4-6% полных ответов,

которые могут быть прочными, но он связан со значительными токсичностями, включающими в себя гипотонию, сердечные аритмии и отек легких. Более подробная информация о стандартном лечении меланомы предусмотрены в Garbe *et al.* (2012) и в NCCN GUIDELINES®, 2013 - меланома. Несмотря на недавнее утверждение ипилимумаб и верумафениб для прогрессирующей MEL, существует все еще большая неудовлетворенная потребность для пациентов, которые продвинулись в терапии с CTLA-4 и ингибитором BRAF (в зависимости от статуса BRAF) или пациентов с ранее не леченой, неоперабельной или метастатической MEL дикого типа BRAF. 5-летняя выживаемость для поздней стадии MEL в настоящее время составляет только 15%.

Почечно-клеточная карцинома

RCC представляет собой наиболее распространенный тип рака почки у взрослых, приходящийся приблизительно на 90% опухолей почек, и 80-90% из них составляют светлоклеточные опухоли (NCCN GUIDELINES®, 2013 - рак почек). Он также представляет собой самый смертоносный из всех опухолей мочеполовых путей. По оценкам, 65150 пациентов будет диагностировано с раком почки и 13680 умрет от этого заболевания в Соединенных Штатах в 2013 году (Siegel *et al.* (2013)).

Для клинически локализованной RCC (стадия IA и IB) хирургическая резекция, включающая в себя радикальную нефрэктомия и органосохраняющую хирургию, представляет собой эффективный способ лечения. Частичная нефрэктомия, как правило, не подходит для пациентов с местно-прогрессирующими опухолями (стадия II и III), в этом случае предпочтительна радикальная нефрэктомия. Если опухоль ограничивается почечной паренхимой, 5-летняя выживаемость составляет 60-70%, но она значительно снижена при заболевании IV стадии, где распространились метастазы. Стадия IV RCC относительно устойчива к RT и химиотерапии, хотя пациенты могут получить выгоду от операции, и циторедуктивная нефрэктомия перед системной терапией рекомендуется для пациентов с потенциально хирургически резектабельной первичной и множественными резектабельными метастазами.

До недавнего времени, цитокины IL-2 и IFN α были единственными активными системными способами лечения прогрессирующей или метастатической RCC, оба обеспечивая сообщенные ORR 5-27%. Тем не менее, из-за ограниченного клинического эффекта каждого из этих средств и существенного профиля токсичности, новые нацеленные средства в значительной степени заменили цитокины в лечении прогрессирующей или метастатической почечно-клеточной карциномы.

Признание важности сигнализации индуцирующего гипоксию фактора альфа (HIF α) в патогенезе светло-клеточной RCC привело к повсеместному изучению двух классов нацеленно воздействующих терапий, антиангиогенных ингибиторов тирозинкиназы (TKI) и мишени ингибиторов рапамицина у млекопитающих (mTOR) в лечении 1L и 2L (Mulders, 2009). Нацеленное воздействие на ангиогенез рационально, поскольку активация конститутивного HIF α приводит к повышающей регуляции или активации нескольких белков, включающих в себя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), который может затем приводить к пролиферации опухоли и образованию новых сосудов. Нацеленное воздействие на путь mTOR важно, потому что активация последующего сигнального пути PI3K/Akt/mTOR представляет собой один из способов, с помощью которого происходит активация или повышающая регуляция конститутивного HIF α (Mulders, 2009). Средства, которые нацелено воздействуют на ангиогенез, включают в себя VEGF-рецептор (VEGFr) TKI (например, сорафениб, сунитиниб, пазопаниб, акситиниб и тивозаниб) и VEGF-связывающие моноклональные антитела (например, бевацизумаб), в то время как средства, которые нацелено воздействуют на путь mTOR включают в себя ингибиторы mTOR (например, эверолимус и темсиролимус) (Mulders, 2009; NCCN GUIDELINES®, 2013 - Рак почки). Тем не менее, большинство пациентов развивают устойчивость, и улучшение OS показано только в одной фазе 3 клинического испытания у пациентов с высоким риском: темсиролимус показал статистически значимое преимущество в OS у пациентов с прогрессирующей RCC, по сравнению с IFN α (10,9 месяцев, по сравнению с 7,3 месяцами) (Hudes *et al.*, 2007). Эверолимус также продемонстрировал улучшение в 2,1 месяца в медианной PFS, по сравнению с плацебо, но без улучшения OS (Motzer *et al.*, 2008). Среди пяти утвержденных анти-ангиогенных средств (сорафениб, сунитиниб, бевацизумаб, пазопаниб и акситиниб) и двух утвержденных ингибиторов mTOR (темсиролимус, эверолимус), только эверолимус утверждается специально для использования после провала лечения с анти-ангиогенной терапией. В США, эверолимус указывается для лечения прогрессирующей RCC после неудачи лечения с сунитинибом или сорафенибом, в то время как в ЕС эверолимус более широко показан для пациентов с прогрессирующей RCC, чье заболевание прогрессировало или после лечения нацелено воздействующей на VEGF терапией.

Немелкоклеточный рак легких

NSCLC представляет собой ведущую причину смерти от рака в США и во всем мире, превышая рак молочной железы, толстой кишки и предстательной железы, вместе

взятых. В США, по оценкам 228190 новых случаев заболевания легких и бронхов диагностируется в США, и приблизительно 159480 летальных исходов случится из-за заболевания (Siegel *et al.*, 2013). Большинство пациентов (приблизительно 78%) диагностируют с прогрессирующим/рецидивирующим или метастатическим заболеванием. Метастазы в надпочечники от рака легких представляют собой обычное явление, причем приблизительно 33% пациентов характеризуются наличием таких метастазов. Способы лечения NSCLC постепенно улучшают OS, но преимущество достигает плато (медианная OS для пациентов на последней стадии составляет всего 1 год). Прогрессирование после 1L терапии происходило почти у всех этих субъектов, 5-летняя выживаемость составляет всего 3,6% при устойчивой обстановке. С 2005 по 2009 год, общая относительная 5-летняя выживаемость при раке легких в США составляла 15,9% (NCCN GUIDELINES®, 2013 - немелкоклеточный рак легких).

Хирургия, RT и химиотерапия представляют собой три способа воздействия, обычно используемые для лечения пациентов с NSCLC. Как класс, NSCLC относительно нечувствительны к химиотерапии и RT, по сравнению с мелкоклеточной карциномой. В общем, для пациентов со стадией I или II заболевания, хирургическое удаление обеспечивает наилучшие шансы на излечение, с химиотерапией, чаще всего используемой как до операции, так и после операции. RT также может быть использована в качестве адъювантной терапии для пациентов с операбельным NSCLC, первичным местным лечением или как паллиативное лечение для пациентов с неизлечимым NSCLC.

Пациенты со стадией IV, у которых наблюдается хороший функциональный статус (PS), получают эффект от химиотерапии. Многие лекарственные средства, включающие в себя лекарственные средства с платиной (например, цисплатин, карбоплатин), таксановые средства (например, паклитаксел, связанный с альбумином паклитаксел, доцетаксел), винорелбин, винбластин, этопозид, пеметрексед и гемцитабин, представляют собой применимые для стадии IV NSCLC. Комбинации, использующие многие из этих лекарственных средств, вызывают 1-летнюю выживаемость, составляющую от 30% до 40% и выше для отдельных средств. Специфические нацелено воздействующие способы лечения были разработаны для лечения прогрессирующего рака легких. Например, бевацизумаб (AVASTIN®) представляет собой моноклональное антитело, которое блокирует сосудистый эндотелиальный фактор роста A (VEGF-A). Эрлотиниб (TARCEVA®) представляет

собой низкомолекулярный TKI рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Кризотиниб (XALKORI®) представляет собой низкомолекулярный TKI, который нацелено воздействует на ALK и MET, и используется для лечения NSCLC у пациентов, несущих мутантный ген слияния *ALK*. Цетуксимаб (ERBITUX®) представляет собой моноклональное антитело, который нацелено воздействует на EGFR.

Существует особенная неудовлетворенная потребность среди пациентов, которые характеризуются наличием плоскоклеточного NSCLC (составляющего до 25% всех NSCLC), поскольку есть несколько вариантов лечения после 1L терапии. Химиотерапия с одним средством представляет собой стандарт лечения после прогрессии с основанной на платине дублетной химиотерапией (Pt-дублет), приводя к медианной OS, равной приблизительно 7 месяцев. Доцетаксел остается базовым лечением в этой линии терапии, хотя эрлотиниб также может быть использован с меньшей частотой. Также было показано, что пеметрексед вызывает клинически эквивалентные результаты по эффективности, но со значительно меньшими нежелательными явлениями, по сравнению с доцетакселом при лечении 2L пациентов с NSCLC (Hanna *et al.*, 2004). Никакая терапия в настоящее время не одобрена для использования при раке легких за установкой 3L. Пеметрексед и бевацизумаб не утверждены при плоскоклеточном NSCLC, и молекулярно нацеленные терапии характеризуются ограниченным применением. Неудовлетворенная потребность при прогрессирующем раке легких усугубляется недавней неудачей онкотиреона и STIMUVAX® Merck KGaA по улучшению OS в 3 фазе клинического испытания, неспособность ингибитора с-Met киназы ArQule-х и Daiichi Sankyo годов, тивантиниба, для достижения конечных точек выживаемости, провал ALIMTA® Eli Lilly в сочетании с Avastin® Roche для улучшения OS в поздней стадии исследования, и фармацевтический провал Amgen и Takeda для достижения конечных точек выживаемости с низкомолекулярным антагонистом VEGF-R, мотесанибом, в поздней стадии испытаний.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как дополнительное ограничение. Содержание всех ссылок, приведенных в настоящей заявке, включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Перекрестная конкуренция между человеческими моноклональными антителами к PD за связывание с экспрессирующими PD-1 человека клетками CHO

Клетки яичника китайского хомячка (CHO), трансфицированные для экспрессии PD-1 человека (CHO/PD-1 клетки) инкубировали с 10 мкг/мл фрагмента Fab человеческого моноклонального антитела к PD-1 5C4 или контрольным антителом изотипа IgG1 человека (hIgG1) в течение 30 минут при 4°C до добавления человеческих моноклональных антител к PD-1 2D3, 7D3 или 4H1 в концентрации 0,2 мкг/мл. Связывание 4H1, 2D3 или 7D3 с клетками CHO/PD-1 обнаруживали с помощью конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) козьего FC-гамма специфического антитела к hIgG. В случае перекрестного конкурентного анализа с 5C4 и 17D8, клетки CHO/PD-1 инкубировали с целой молекулой 5C4 перед добавлением меченого FITC 17D8. Связывание 2D3, 7D3, 4H1 или 17D8 с клетками CHO/PD-1 измеряли с помощью анализа проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Результаты представлены на фиг. 1. Данные показывают, что фрагмент Fab 5C4, по существу, блокировал связывание самих моноклональных антител 5C4, а также связывание 2D3, 7D3 (фиг. 1A) и 4H1 (фиг. 1B), в то время как целое моноклональное антитело 5C4 по существу блокировало связывание 17D8 (фиг. 1C) с клетками CHO/PD-1, как измерено средней интенсивностью флуоресценции (MFI) окрашивания.

Пример 2

Перекрестная конкуренция между человеческими моноклональными антителами к PD-L1 за связывание с экспрессирующими PD-1 человека клетками CHO

Клетки CHO, трансфицированные для экспрессии hPD-L1 (CHO/PD-L1 клетки) инкубировали с 10 мкг/мл каждого из десяти неконъюгированных моноклональных антител к PD-L1 человека (5F8, 7H1, 10H10, 1B12, 3G10, 10A5, 11E6, 12A4, 12B7 и 13G4) или контрольным антителом изотипа IgG1 человека (hIgG1) в течение 20 мин при 4°C. Конъюгированные с FITC 10H10 (A), 3G10 (B), 10A5 (C), 11E6 (D), 12A4 (E) или 13G4 (F) добавляли к клеткам до конечной концентрации 0,09 мкг/мл (B, D), 0,27 мкг/мл (A, C), 0,91 мкг/мл (F) или 2,73 мкг/мл (E) в течение дополнительных 20 мин при 4°C без предварительного отмывания несвязанного, неконъюгированного антитела. Различные количества различных конъюгированных с FITC человеческих

моноклональные антитела использованы из-за различий в эффективности связывания после мечения, и оптимальные количества этих конъюгированных с FITC человеческих моноклональных антител ранее определяли с помощью анализа титрования дозы связывания с клетками CHO/PD-L1. Связывание конъюгированных с FITC 10H10, 3G10, 10A5, 11E6, 12A4 или 13G4 с клетками CHO/PD-L1 измеряли с помощью проточной цитометрии.

Результаты показаны на фиг. 2. Связывание меченого 10H10 частично блокировалось 10A5, 11E6 и 13G4, но, по существу, блокировалось только самим собой (фиг. 2A). С другой стороны, 10H10 существенно блокировало связывание только самого себя с клетками CHO/PD-L1. Каждое из человеческих моноклональных антител к PD-L1 5F8, 7H1, 1B12, 3G10, 10A5, 11E6, 12A4, 12B7 и 13G4 существенно блокировало связывание меченых моноклональных антител 3G10 (фиг. 2B), 10A5 (фиг. 2C), 11E6 (фиг. 2D), 12A4 (фиг. 2E) и 13G4 (фиг. 2F) с клетками CHO/PD-L1, как измерено с помощью MFI, хотя моноклональные антитела 5F8 и 13G4 в целом блокировали связывание меченых моноклональных антител в несколько меньшей степени.

Пример 3

Перекрестная конкуренция между моноклональными антителами к PD-L1 за связывание с экспрессирующими PD-L1 человека клетками карциномы яичника

Человеческие моноклональные антитела к PD-L1 5F8, 12B7, 3G10, 1B12, 13G4, 10H10, 10A5 и 12A4 и контрольное антитело изотипа IgG1 человека (hIgG1) серийно разводили от 10 мкг/мл и инкубировали с экспрессирующими hPD-L1 клетками карциномы яичника ES-2 в течение 20 минут при 4°C. Без отмывания биотинилированное антитело 12A4 добавляли до конечной концентрации 0,4 мкг/мл в течение дополнительных 20 минут при 4°C. После отмывания связывание биотин-12A4 обнаруживали с использованием флуоресцентного стрептавидин-PE вторичного реагента и измеряли с помощью проточной цитометрии. На фиг. 3 показана флуоресценция связанного биотин-12A4 в виде зависимости от концентрации немеченых человеческих моноклональных антител hPD-L1. Связывание биотин-12A4 с клетками ES-2 существенно блокировалось самим 12A4 и 1B12 и 12B7, и блокировалось от умеренной до значительной степени моноклональными антителами 5F8, 10A5, 13G4 и 3G10, но не блокировалось моноклональным антителом 10H10.

Пример 4

Дизайн фазы 1 клинического исследования антитела к PD-1

Исследования фазы 1 проводили для оценки безопасности, противоопухолевой активности и фармакокинетики анти-PD-1 у пациентов с выбранными прогрессирующими солидными опухолями. Моноклональное антитело к PD-1 человека, BMS-936558 (также называемое в настоящем документе как ниволумаб, и в патенте США № 8008449, как 5C4) вводили в виде внутривенной инфузии каждые 2 недели каждого 8-недельного цикла лечения. Статус опухоли переоценивался после каждого цикла. Пациенты продолжали лечение до 2 лет (12 циклов), пока они не испытали полную ремиссию, неприемлемую токсичность, прогрессирование заболевания или отзывали свое согласие. У пациентов, которые были без учета этого обстоятельства клинически стабильны, исследование лечения было продолжено за рамки видимого исходного прогрессирования заболевания, пока не было отмечено дальнейшего прогрессирования в соответствии с рекомендацией предполагаемых критериев иммунного ответа (Wolchok *et al.*, 2009). Пациенты со стабильным заболеванием (SD) или постоянным объективным ответом (OR: полный ответ [CR] или частичный ответ [PR]) в конце лечения продолжали в течение 1 года и им было предложено повторное лечение в течение 1 дополнительного года в случае прогрессии.

Повышение дозы

Пациенты с прогрессирующей меланомой (MEL), немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), почечно-клеточной карциномой (RCC), кастрационно-резистентным раком предстательной железы (CRPC) и колоректальным раком (CRC) характеризовались возможностью включиться в исследование. Когорты по 3-6 пациентов в дозе включались последовательно при 1,0, 3,0 и 10,0 мг/кг. Повышение дозы происходило, когда минимум 3 пациента завершали период оценки безопасности (56 дней) на данном уровне дозы, с дозолимитирующей токсичностью менее чем у одной трети пациентов. Увеличение дозы у одного и того же пациента не было разрешено.

Расширение когорты

Максимально переносимая доза (MTD) не была достигнута. Первоначально 5 расширенных когорт из приблизительно 16 пациентов каждая включали 10 мг/кг для MEL, NSCLC, RCC, CRPC и CRC. На основании исходных сигналов активности и после 6,5-месячного перерыва для поправки протокола, дополнительные расширенные когорты из приблизительно 16 пациентов каждая зарегистрированы для MEL (при 1,0 и 3,0 мг/кг, затем когорты рандомизировали на 0,1, 0,3 или 1,0 мг/кг),

NSCLC (когорты с плоскоклеточной или неплоскоклеточной гистологией рандомизировали на 1, 3 или 10 мг/кг) и RCC (по 1,0 мг/кг). Увеличение дозы у одного и того же пациента до 1 мг/кг было разрешено для пациентов с MEL с прогрессирующим заболеванием после получения 0,1 или 0,3 мг/кг.

Пациенты

Были задокументированы подходящие пациенты с прогрессирующими солидными опухолями; возраст > 18 лет; ожидаемая продолжительность жизни > 12 недель; функциональный статус Восточной объединенной онкологической группы ≤ 2; измеримое заболевание с помощью критерия оценки ответа солидных опухолей (RECIST), v1.0 с модификацией (смотрите Topalian *et al.*, 2012b); адекватной гематологической, печеночной и почечной функцией; и получали 1-5 предыдущих системных схем лечения. Пациенты со стабильно обрабатываемыми метастазами в головной мозг были зачислены. Критерии исключения включали в себя историю хронического аутоиммунного заболевания, предшествующий курс лечения с модулирующими Т-клетки антителами (например, к CTLA-4, к PD-1, к PD-L1), условия, требующие иммуносупрессивных препаратов и хронические инфекции (например, ВИЧ, гепатит В или С).

В общей сложности 296 больных с прогрессирующими солидными опухолями, включающими в себя MEL (n = 104), NSCLC (n = 122), RCC (n = 34), CRPC (n = 17) и CRC (n = 19) подвергали воздействию BMS- 936558 в течение 40 месяцев до февраля 2012 г. К марту 2013 г. 306 больных, включая пациентов с немелкоклеточным раком легкого (n = 129), меланомой (n = 107), RCC (n = 34), CRPC (n = 17) и CRC (n = 19) подвергали воздействию BMS-936558 с октября 2008 г. по январь 2012 г., все с минимум одним годом наблюдения. Два пациента не получили полный цикл воздействия и не рассматривались как пациенты с поддающимися оценке ответами. Средний возраст составил 63 года (диапазон 29-85). Оценка производительности ECOG составляла 0 или 1 у 98% пациентов. Большинство пациентов характеризовались наличием интенсивной предшествующей терапии, 47% получали по меньшей мере 3 предшествующих курса химиотерапии. Известные предшествующие курсы лечения включали иммунотерапию (64%) и ингибитор B-RAF (8%) у пациентов с MEL; основанную на платине химиотерапию (94%) и ингибиторы тирозинкиназы (TKI, 34%) у пациентов с NSCLC; и нефрэктомия (94%), иммунотерапию (59%) и анти-ангиогенную терапию (74%) у пациентов с RCC. Исходные характеристики общей обработанной популяции (N=306) были аналогичны

таковой популяции эффективности (пациентов с поддающимися оценке ответами, N=270). Подробности о предварительном воздействии на пациентов приведены в Toralian *et al.* (2012b).

Статистический анализ

Исходные характеристики и нежелательные явления для всех подвергающихся воздействию пациентов (N=306), и результаты эффективности для 270 пациентов с раком легких, меланомой и раком почки сообщались в марте 2013 г. Фармакокинетические и молекулярно-маркерные популяции состояли из подвергающихся воздействию пациентов с имеющимися данными по состоянию на февраль 2012 г., дату предварительного анализа. Популяция эффективности состояла из пациентов с поддающимися оценке ответами, начинающими лечение по меньшей мере за 8 месяцев до даты анализа. Измерения опухолей проводили после каждого цикла воздействия (4 дозы) с помощью исследователей. Индивидуальные лучшие объективные ответы, основанные на опухолевых измерениях, оценивались спонсором на модифицированной RECIST v1.0. Объективный ответ подтверждали по меньшей мере с помощью одной последовательной оценки опухоли. Объективный ответ и стабильные темпы заболевания оценивали с доверительными интервалами с использованием способа Клоппера-Пирсона. Конечные точки времени до момента наступления событий, включающие в себя PFS, OS, выживаемость и продолжительности ответа, оценивали по способу Каплана-Мейера. Нежелательные явления были закодированы с использованием медицинского словаря для регуляторной активности (MedDRA), версия 15.1. Отдельные нежелательные явления с потенциальной иммунологической этиологией, также именуемые как "связанные с иммунной системой нежелательные явления" "представляющие особый интерес AE" (AEOSI), определенные как нежелательные явления, которые требуют более частого контроля и/или уникального вмешательства, определяли с использованием предварительно определенного списка терминов MeDRA. Индивидуальные лучшие OR получали из доложенных исследователями данных, сообщаемых в модифицированной RECIST v1.0. OR подтверждали по меньшей мере одной последовательной оценкой опухоли, и рассчитывали скорость OR ($ORP = \{[CR + PR] \div N\} \times 100$).

Пример 5

Оценки безопасности на пациентах, получавших антитела к PD-1

Оценка безопасности, включающая в себя клиническое обследование и лабораторные оценки, проводилась у всех пациентов в начале исследования и через регулярные промежутки времени до 100 дней после последнего введения препарата. Тяжесть нежелательных явлений оценивали на основе общей терминологии критериев нежелательных явлений NCI (NCI CTCAE), v3.0. Компьютерную томографию (КТ) или магнитно-резонансную томографию проводили для оценки опухоли в начале и после каждого цикла лечения.

MTD не был определен в дозах BMS-936558, изученных в этом исследовании, до самой высокой запланированной дозы 10 мг/кг. Относительная интенсивность дозы BMS-936558 90% или выше была достигнута у 87% пациентов (смотрите Topalian *et al.*, 2012b; Topalian *et al.*, 2013, для более подробной информации). АЕ были закодированы с использованием медицинского словаря для регуляторных активностей (MedDRA), версия 14.1. АЕОСИ определяли с использованием заранее определенного списка терминов MedDRA. Пятнадцать из 296 (5%) пациентов прекратили лечение из-за связанных с BMS-936558 АЕ. По состоянию на февраль 2012 г., даты предварительного анализа, 62 (21%) пациентов умерли, а в марте 2013 года 195 пациентов (64%) умерли, с прогрессированием заболевания, которое было наиболее распространенной причиной смерти (Topalian *et al.*, 2012b; Topalian *et al.*, 2013).

Наиболее частые нежелательные явления, независимо от причинности, включали в себя усталость, снижение аппетита, диарею, тошноту, кашель, одышку, запор, рвоту, сыпь, гипертермию и зуд (Topalian *et al.*, 2012b; Topalian *et al.*, 2013). Общие связанные с BMS-936558 нежелательные явления включали в себя усталость, сыпь, понос, снижение аппетита, тошноту. Большинство явлений были низкой степени тяжести с 3-4 степенью тяжести, связанной с лекарственными средствами АЕ, наблюдавшихся у 41 из 296 (14%) пациентов. Связанные с лечением АЕ (любой степени) наблюдались в 230 из 306 пациентов (75%), наиболее распространенные из которых представляют собой усталость, сыпь, диарею и зуд (Topalian *et al.*, 2013). Спектр, частота и тяжесть связанных с BMS-936558 АЕ были в целом аналогичны в уровнях дозировок, которые исследовались, без четкого отношения к продолжительности лечения. Пятьдесят два из 306 пациентов (17%) испытывали 3-4 степень тяжести связанных с лечением нежелательных явлений, наиболее распространенные из которых представляет собой усталость (2%), пневмонию, лимфопению, диарею, боль в животе и гипофосфатемию (по 1%). Связанные с

лечением серьезные нежелательные явления происходили у 42 из 306 пациентов (14%) (Topalian *et al.*, 2013).

Связанные с лекарственными средствами AEOSI с потенциальными связанными с иммунной системой этиологиями классифицировали по вовлечению органов, чтобы обеспечить более точную оценку частоты, и они включали в себя пневмонию, витилиго, колит, гепатит, гипофизит и тиреоидит и другие. Связанные с лечением отдельные нежелательные явления любой степени тяжести наблюдались у 140 из 306 пациентов (46%), наиболее распространенные из которых представляли собой сыпь (15%), диарею (13%) и зуд (11%) (таблица 2). Связанные с лечением отдельные нежелательные явления 3-4 степени тяжести были замечены у 19 пациентов (6%).

Пятьдесят два из 230 пациентов (23%) со связанными с лекарственными средствами нежелательными явлениями требовали сдерживания развития системными глюкокортикоидами и/или другими иммунодепрессантами. Печеночные и желудочно-кишечные AEOSI сдерживали с прерыванием на лечение и, при необходимости, введением кортикостероидов. Среди пациентов, получавших лечение до даты, эти АЕ были обратимы во всех случаях. Эндокринные AEOSI сдерживали заместительной терапией. Тридцать два из 306 пациентов (11%) прекратили лечение из-за связанных с лечением нежелательных явлений. По усмотрению лечащего врача пациенты успешно возобновляли лечение с BMS-936558. Двадцать один (40%) пациент смог возобновить терапию ниволумабом после разрешения токсичности.

Связанный с лекарственными средствами пневмонит (любой степени тяжести) происходил у 12 из 306 (4%) пациентов (Topalian *et al.*, 2013). Клинические проявления варьировались от рентгенологических отклонений у бессимптомных пациентов до прогрессивных, развернутых, диффузных легочных инфильтратов, связанных с симптомами (кашель, лихорадка, одышка). Пневмонит 3-4 степени тяжести развивался у 4 больных (1%), из которых 3 случая закончились смертельным исходом (2 пациента с немелкоклеточным NSCLC, 1 CRC). Не было отмечено четкой зависимости между возникновением пневмонита и типом опухоли, уровнем дозы или числом полученных доз. У 9 из 12 пациентов пневмонит носил обратимый характер с прекращением лечения и/или иммуносупрессией (глюкокортикоиды, инфликсимаб, микофенолат). После последней связанной с пневмонитом смерти в ноябре 2011 г., 79 пациентов продолжали получать ниволумаб (медиана 29 недели, диапазон 2-69 недель) при отсутствии других смертей от этой или других причин, связанных с лечением.

Пример 6

Анализы фармакокинетики/фармакодинамики антитела к PD-1

Для фармакокинетического (ПК) анализа серийные образцы крови собирали, и концентрации сыворотки BMS-936558 количественно определяли с использованием ELISA. Для фармакодинамического анализа (PD) мононуклеарные клетки периферической крови выделяли от пациентов на исходном уровне и после цикла 1 для оценки оккупации рецепторов (RO) PD-1 с помощью BMS-936558 на циркулирующих CD3⁺ Т-клетках с помощью проточной цитометрии (Brahmer *et al.*, 2010).

Максимальная концентрация BMS-936558 наблюдалась при медиане T_{max} через 1-4 часов после начала инфузии. PK BMS-936558 был линейным при пропорциональном дозе увеличении C_{max} и AUC_(0-14 d) в диапазоне доз 0,1-10 мг/кг (n = 35). PD BMS-936558 оценивали с помощью RO PD-1 на циркулирующих Т-клетках. PBMC от 65 пациентов с MEL, подвергавшихся воздействию одного цикла BMS-936558 на 0,1-10 мг/кг два раза в неделю продемонстрировали среднюю оккупацию молекул PD-1 на циркулирующих CD3⁺ Т-клетках путем BMS-936558 в диапазоне от 64% -70% (смотрите Topalian *et al.*, 2012b, для более подробной информации).

Пример 7

Противоопухолевая эффективность, проявляемая антителом к PD-1

Анализ данных на феврале 2012 г.

Клиническую противоопухолевую активность наблюдали во всех испытанных дозах BMS-936558. OR (подтвержденные CR или PR) наблюдались в значительной части пациентов с NSCLC, MEL и RCC (таблицы 1 и 2; фигура 4), а также в различных участках метастазирования заболевания, включающих в себя печень, легкое, лимфатические узлы и кости (фиг. 5-7 и не показано). Опухолевые регрессии после обычных, а также "связанных с иммунной системой" паттернов ответа, такие, как длительное снижение бремени опухоли в присутствии новых очагов. Индивидуальные лучшие общие ответы получали от доложенных исследователями данных, в соответствии с модифицированной RECIST v1.0. OR подтверждали по меньшей мере одной последовательной оценкой опухоли. Во время анализа данных 2 пациента с NSCLC, которых лечили 10 мг/кг характеризовались наличием неподтвержденных ответов, и 8 дополнительных пациентов (с MEL, NSCLC или RCC) характеризовались

постоянным снижением базовых повреждений-мишеней в присутствии новых поражений (т.е. "связанный с иммунной системой" паттерн ответов). Ни один из этих пациентов не классифицировался как отвечающий на лечение для целей количественного определения OR. Противоопухолевые ответы и/или длительная стабилизация заболевания наблюдались у пациентов, независимо от предыдущих полученных способов лечения (смотрите резюме прогрессирования свободного интервала для пациентов с OR и SD в дополнительном приложении 4 Topalian *et al.*, 2012b).

У пациентов с NSCLC 14 OR наблюдались при BMS-936558 в дозах 1, 3 или 10 мг/кг с частотой отклика 6%, 32% и 18%, соответственно. OR наблюдались с гистологией NSCLC: 6 отвечающих на лечение из 18 плоскоклеточных (33%), 7 отвечающих на лечение из 56 неплюскоклеточного (13%), и 1 из 2 неизвестных. Все 14 пациентов с OR начинали лечение за ≥ 24 недель до анализа данных, и из них 8 характеризовались продолжительностью ответа ≥ 24 недель (табл. 1). Стабильное заболевание (SD) длительностью ≥ 24 недель наблюдалось у 5 (7%) пациентов с NSCLC, все с неплюскоклеточной гистологией. Среди пациентов с MEL, 26 OR наблюдались при дозах в пределах от 0,1-10 мг/кг с уровнем ответов от 19% -41% на уровень дозы. При уровне дозы 3 мг/кг OR отмечали у 7 из 17 (41%) пациентов. Из 26 пациентов с MEL, достигших OR, 17 начали лечение за ≥ 1 год до анализа данных, и из них 13 пациентов характеризовались продолжительностью OR ≥ 1 года. Остальные 8 пациентов с OR были в исследования < 1 года и 6 характеризовались ответами в диапазоне от 1,9-5,6 месяцев. SD длительностью ≥ 24 недель наблюдался у 6 (6%) пациентов. У пациентов с RCC, OR происходили у 4 из 17 (24%) пациентов, подвергавшихся воздействию с BMS-936558 в дозе 1 мг/кг и 5 из 16 (31%) пациентов, получавших 10 мг/кг. Среди 8 пациентов RCC с OR, которые начали лечение за ≥ 1 год до анализа данных, 5 (63%) характеризовались продолжительностью OR ≥ 1 год. Наблюдался прочный SD ≥ 24 недель у дополнительных 9 (27%) больных.

Таблица 1. Клиническая активность BMS-936558 в популяции эффективности* (N = 236)[†], как оценено до февраля 2012

Тип опухоли	Доза (мг/кг)	n	ORR [‡] Кол-во пациентов (%) [95% CI] [‡]	SD ≥ 24 нед. Кол-во пациентов (%) [95% CI]	PFSR [§] в 24 нед (%) [95% CI]
-------------	-----------------	---	--	--	---

Тип опухоли	Доза (мг/кг)	n	ORR [‡] Кол-во пациентов (%) [95% CI] [†]	SD ≥ 24 нед. Кол-во пациентов (%) [95% CI]	PFSR [§] в 24 нед (%) [95% CI]
MEL	0,1	14	4 (29) [8-58]	1 (7) [0,2-34]	40 [13-66]
	1,0	27	8 (30) [14-50]	3 (11) [2-29]	45 [26-65]
	3,0	17	7 (41) [18-67]	1 (6) [0,1-29]	55 [30-80]
	10,0	20	4 (20) [6-44]	0	30 [9-51]
Все MEL		94	26 (28) [19-38]	6 (6) [2-13]	41 [30-51]
NSCLC**					
Все	1	18	1 (6) [0,1-27]	1 (6) [0,1-27]	16 [0-34]
Плоскоклеточн.	1	5	0	0	0
Неплоскоклет.	1	12	0	1 (8) [0,2-39]	14 [0-37]
Неизвестн.	1	1	1(100) [3-100]	0	1
Все	3	19	6 (32) [13-57]	2 (11) [1-33]	41 [18-64]
Плоскоклеточн.	3	6	3 (50) [12-88]	0	50 [10-90]
Неплоскоклет.	3	13	3 (23) [5-54]	2 (15) [2-45]	37 [10-64]
Все	10	39	7 (18) [8-34]	2 (5) [0,6-17]	24 [11-38]
Плоскоклеточн.	10	7	3 (43) [10-82]	0	43 [6-80]
Неплоскоклет.	10	31	4 (13) [4-30]	2 (7) [0,8-21]	21 [6-36]
Неизвешн.	10	1	0	0	0
Все NSCLC		76	14 (18) [11-29]	5 (7) [2-15]	26 [16-36]
Все плоскоклеточн.		18	6 (33) [13-59]	0	33 [12-55]
Все неплоскоклет.		56	7 (13) [5-24]	5 (9) [3-20]	22 [11-34]
RCC	1	17	4 (24) [7-50]	4 (24) [7-50]	47 [23-71]
	10	16	5 (31) [11-59] [‡]	5 (31) [11-59] [‡]	67 [43-91]
Все RCC		33	9 (27) [13-46]	9 (27) [13-46]	56 [39-73]

* Популяция эффективности состоит из способных к ответу пациентов, лечение которых было начато по меньшей мере за 8 месяцев до анализа данных в феврале 2012 года, и характеризовались наличием измеримого заболевания на начальном уровне и одним из следующего: по меньшей мере 1 сканированием при лечении или клиническим доказательством прогрессирования заболевания или смерти.

† CR обозначает полный ответ, MEL меланома, NSCLC немелкоклеточный рак легкого, ORR частота объективного ответа, PFSR выживаемость без прогрессирования, PR частичный ответ, RCC почечно-клеточный рак, SD стабильное заболевание, n количество пациентов.

‡ Частоты объективных ответов ($\{[CR + PR] \div n\} \times 100$) были рассчитаны на основе подтвержденных ответов с доверительными интервалами, рассчитанными с использованием способа Клоппера-Пирсона. Индивидуальные ответы пациентов вынесены в RECIST v1.0 с модификацией (смотрите Topalian *et al.*, 2012b).

§ Выживаемость без прогрессирования представляла собой долю пациентов, которые не прогрессировали и были живы через 24 недели, рассчитанная по методологии Каплан-Мейера с доверительными интервалами с использованием способа Greenwood.

¶ Один CR.

** Один пациент с NSCLC, который получал уровень дозы 3 мг/кг, характеризовался начальной оценкой прогрессирования заболевания, впоследствии характеризовался наличием PR и был классифицирован как отвечающий на лечение.

Таблица 2. Продолжительность объективных ответов на BMS-936558*, что оценено на февраль 2012 г.

Тип опухоли	Доза (мг/кг)	Кол-во пациентов с OR	Продолжительность ответов (месяцы) [†]
MEL	0,1	4	7,5+, 5,6+, 5,6, 5,6
	0,3	3	3,8+, 2,1+, 1,9+
	1	8	24,9+, 22,9, 20,3+, 19,3+, 18,4+, 7,6+, 5,6+, 5,3+
	3	7	22,4+, 18,3+, 15,2+, 12,9, 11,1, 9,3, 9,2+
	10	4	24,6+, 23,9+, 18,0+, 17,0
NSCLC [§]	1	1	9,2+
	3	6	30,8+, 7,6+, 5,5+, 3,7+, 1,9+, NA [‡]
	10	7	14,8+, 7,6+, 7,3+, 6,7, 4,2, 3,7+, 3,7
RCC	1	4	17,5+, 9,2+, 9,2, 5,6+
	10	5	22,3+, 21,7+, 12,9, 12,0, 8,4

* MEL обозначает меланому, NA не применимый, NSCLC немелкоклеточный рак легкого, RCC почечно-клеточный рак.

† Время от первого ответа до времени задокументированной прогрессии, летального исхода или для подвергнутых цензуре данных, время до последней оценки опухоли.

‡ Один пациент подвергнулся лечению за пределами первоначальной оценки прогрессирования заболевания и впоследствии характеризовался PR; этот пациент был классифицирован как отвечающий на лечение для целей количественного определения числа ответов с помощью RECIST v1.0, но не рассматривался для количественного определения продолжительности ответа.

Анализ данных по состоянию на март 2013 г.

Объективные ответы наблюдались у пациентов с NSCLC (17%), MEL (31%) и RCC (29%), но не с CRC или CRPC. Ответы были обнаружены во всех исследованных дозах ниволумаба; частота ответа у пациентов с NSCLC, получавших 1 мг/кг, по сравнению с 3 или 10 мг/кг, по-видимому, уменьшалась (3%, по сравнению с 24% и 20%, соответственно) (таблицы 3 и 4). Тринадцать из 270 пациентов (4,8%) с отвечающими гистологиями характеризовались нестандартными паттернами ответа, которые не соответствовали критериям RECIST (например, постоянное снижение в поражениях-мишенях в присутствии новых поражений или регрессии после первоначальной прогрессии) (Wolchok *et al*, 2009). Дополнительные пациенты проявляли SD на протяжении 24 недель и более (10% NSCLC, 7% MEL, 27% RCC). Устойчивое выживание, отражаемое 1- и 2-летними граничными OS, было отмечено в каждой из отвечающих на лечение популяций следующим образом: NSCLC 42% и 14%; MEL 62% и 43% и RCC 70% и 50% (таблица 3). Наблюдалась средняя OS, равная 9,6 месяцев для рака легкого (9,2 и 10,1 месяцев для плоскоклеточной и неплоскоклеточной гистологии NSCLC, соответственно), 16,8 месяцев для MEL и более 22 месяцев для RCC; средняя PFS составляла 2,3 месяца при NSCLC, 3,7 месяца при MEL и 7,3 месяцев при RCC; и средняя продолжительность ответа составляла 74, 104 и 56 недель, соответственно (таблица 4). Среди 16 отвечающих на лечение пациентов, прекративших лечение по причинам, отличным от прогрессирования заболевания и через по меньшей мере 24 недели, 13 (81%) оставались в ответе на момент анализа (фиг. 8).

Таблица 3. Клиническая активность ниволумаба в популяции эффективности (N = 306)*, оцененная на март 2013 г.

Тип опухоли	ORR [†] Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]	Средняя продолжит. ответа [‡] , нед. (диапазон)	Стабильное заболевание		Средняя выживаемость без прогресс., мес (95% CI)	Средняя общая выживаемость, мес (95% CI)	Уровень общей выживаемости, % (95% CI); пациенты в зоне риска, n	
			≥ 24 нед	≥ 48 нед			1 год	2 года
Немелкоклеточный рак легкого**	22/129 (17,1) [11,0, 24,7]	74,0 (6,1+, 133,9+)	13/129 (10,1) [5,5, 16,6]	6/129 (4,7) [1,7, 9,8]	2,3 (1,9, 3,7)	9,6 (7,8, 12,4)	42 (33, 51); 43	14 (4, 24); 5
Плоскоклеточный	9/54 (16,7) [7,9, 29,3]	NR [§] (16,1, 133,9+)	8/54 (14,8) [6,6, 27,1]	3/54 (5,6) [1,2, 15,4]	3,7 (1,8, 7,2)	9,2 (7,3, 12,5)	39 (25, 53):16	¶
Неплоскоклеточн.	13/74 (17,6) [9,7, 28,2]	63,9 (6,1+, 74,0+)	5/74 (6,8) [2,2, 15,1]	3/74 (4,1) [0,8, 11,4]	2,0 (1,8, 3,6)	10,1 (7,2, 13,7)	43 (31, 54): 26	¶
Меланома	33/107 (30,8) [22,3, 40,5]	104 (18,4, 117,0+)	7/107 (6,5) [2,7, 13,0]	4/107 (3,7) [1,0, 9,3]	3,7 (1,9, 9,1)	16,8 (12,5, 31,6)	62 (53, 72); 55	43 (32, 53); 26
Рак почки	10/34 (29,4) [15,1, 47,5]	56,1 (36,6, 126,7+)	9/34 (26,5) [12,9, 44,4]	2/34 (5,9) [0,7, 19,7]	7,3 (3,7, 12,9)	>22 [#] (13,6, NE [^])	70 (55, 86); 23	50 (31, 70); 8

* Не было замечено объективных ответов у 19 пациентов с колоректальным раком или 17 пациентов с кастрационно-резистентным раком предстательной железы.

† Объективные показатели реагирования ($\{[CR + PR] \div N\} \times 100$) были рассчитаны на основе подтвержденных ответов с доверительными интервалами, рассчитанными с использованием способа Клоппер-Пирсона. Индивидуальные ответы пациентов были вынесены в RECIST v1.0 с модификацией (смотрите способы S1 и протокол исследования, NEJM.org).

‡ Время от первого ответа до времени задокументированной прогрессии, летального исхода или для подвергнутых цензуре данных (обозначенных "+"), время до последней оценки опухоли.

** Среди 129 пациентов с немелкоклеточным раком легких 1 характеризовался неизвестной гистологией и не показал объективного ответа. Другие характеризовались плоскоклеточной или неплоскоклеточной гистологией, как указано.

§ NR, не достигнутый; момент времени, в который вероятность того, что прогресс отвечающих на лечение пациентов падает ниже 50%, не был достигнут из-за недостаточного количества событий и/или продолжения.

¶ Недостаточный период продолжения.

|| 1 CR был отмечен при меланоме и 1 CR при раке почки.

Медиана общей выживаемости не была достигнута на 22 месяце, самый длинный времени до смерти до сих пор у пациентов со злокачественной опухолью почки в этом клиническом исследовании.

^ NE, не оцениваемый.

Таблица 4. Клиническая активность ниволумаба от уровня дозы, оцененная до марта 2013 г.

Тип опухоли	Доза, мг/кг	ORR* Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]	Средняя продолжительность ответа, нед, (диапазон) [†]	Стабильное заболевание Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]		Средняя выживаемость без прогресс., мес (95% CI)	Средняя общая выживаемость, мес (95% CI)
				≥ 24 нед	≥ 48 нед		
Немелкоклеточный рак легких	Все дозы	22/129 (17,1) [11,0, 24,7]	74,0 (6,1+, 133,9+)	13/129 (10,1) [5,5, 16,6]	6/129 (4,7) [1,7, 9,8]	2,3 (1,9, 3,7)	9,6 (7,8, 12,4)
	1	1/33 (3,0) [0,1, 15,8]	63,9 (63,9, 63,9)	5/33 (15,2) [5,1, 31,9]	2/33 (6,1) [0,7, 20,2]	1,9 (1,8, 3,6)	9,2 (5,6, 11,1)
	3	9/37 (24,3) [11,8, 41,2]	NR [‡] (16,1+, 133,9+)	3/37 (8,1) [1,7, 21,9]	2/37 (5,4) [0,7, 18,2]	1,9 (1,7, 7,3)	14,9 (9,5, NE [^])
	10	12/59 (20,3) [11,0, 32,8]	83,1 (6,1+, 117,1+)	5/59 (8,5) [2,8, 18,7]	2/59 (3,4) [0,4, 11,7]	3,6 (1,9, 3,8)	9,2 (5,2, 12,4)
Плоскоклеточный	Все дозы	9/54 (16,7) [7,9, 29,3]	NR (16,1, 133,9+)	8/54 (14,8) [6,6, 27,1]	3/54 (5,6) [1,2, 15,4]	3,7 (1,8, 7,2)	9,2 (7,3, 12,5)
	1	0	0	4/15 (26,7) [7,8, 55,1]	1/15 (6,7) [0,2, 31,9]	1,9 (1,8, 7,5)	8,0 (2,6, 13,3)
	3	4/18 (22,2) [6,4, 47,6]	NR (16,1, 133,9+)	1/18 (5,6) [0,1, 27,3]	1/18 (5,6) [0,1, 27,3]	3,8 (1,7, 14,9)	9,5, (6,7, NE)

Тип опухоли	Доза, мг/кг	ORR* Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]	Средняя продолжительность ответа, нед, (диапазон) [†]	Стабильное заболевание Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]		Средняя выживаемость без прогресс., мес (95% CI)	Средняя общая выживаемость, мес (95% CI)
				≥ 24 нед	≥ 48 нед		
	10	5/21 (23,8) [8,2, 47,2]	83,1 (16,1, 117+)	3/21 (14,3) [3,0, 36,3]	1/21 (4,8) [0,1, 23,8]	4,1 (1,8, 7,6)	10,5 (7,8, 12,5)
Неплоскоклеточный	Все дозы	13/74 (17,6) [9,7, 28,2]	63,9 (6,1+, 74,0+)	5/74 (6,8) [2,2, 15,1]	3/74 (4,1) [0,8, 11,4]	2,0 (1,8, 3,6)	10,1 (7,2, 13,7)
	1	1/18 (5,6) [0,1, 27,3]	63,9 (63,9, 63,9)	1/18 (5,6) [0,1, 27,3]	1/18 (5,6) [0,1, 27,3]	1,8 (1,7, 3,6)	9,9 (5,6, 22,7)
	3	5/19 (26,3) [9,1, 51,2]	74,0 (24,3, 74,0+)	2/19 (10,5) [1,3, 33,1]	1/19 (5,3) [0,1, 26,0]	1,8 (1,7, 12,5)	18,2 (10,3, 18,2)
	10	7/37 (18,9) [8,0, 35,2]	NR (6,1+, 65,7+)	2/37 (5,4) [0,7, 18,2]	1/37 (2,7) [0,1, 14,2]	2,3 (1,9, 3,8)	7,4 (4,6, 12,4)
Меланома [§]	Все дозы	33/107 (30,8) [22,3, 40,5]	104 (18,4, 117,0+)	7 (6,5) [2,7, 13,0]	4 (3,7) [1,0, 9,3]	3,7 (1,9, 9,1)	16,8 (12,5, 31,6)
	0,1 [¶]	6/17 (35,3) [14,2, 61,7]	NR (24,1, 48,7+)	0	0	3,6 (1,7, 9,1)	16,2 (8,6, NE)
	0,3 [¶]	5/18 (27,8) [9,7, 53,5]	NR (18,4, 66,3+)	1 (5,6) [0,1, 27,3]	0	1,9 (1,8, 9,3)	12,5 (7,7, NE)

Тип опухоли	Доза, мг/кг	ORR* Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]	Средняя продолжительность ответа, нед, (диапазон) [†]	Стабильное заболевание Кол-во пациентов/общее кол-во пациентов (%) [95% CI]		Средняя выживаемость без прогресс., мес (95% CI)	Средняя общая выживаемость, мес (95% CI)
				≥ 24 нед	≥ 48 нед		
	1	11/35 (31,4) [16,9, 49,3]	104 (32,4, 108,1+)	5/35 (14,3) [4,8, 30,3]	4/35 (11,4) [3,2, 26,7]	9,1 (1,8, 24,7)	25,3 (14,6, NE)
	3	7/17 (41,2) [16,9, 67,1]	75,9 (40,1+, 115,4+)	1/17 (5,9) [0,1, 28,7]	0	9,7 (1,9, 16,4)	20,3 (8,2, NE)
	10	4/20 (20,0) [5,7, 43,7]	112 (73,9, 117+)	0	0	3,7 (1,7, 20,50)	11,7 (7,2, 37,8)
Рак почки [§]	Все дозы	10/34 (29,4) [15,1, 47,5]	56,1 (36,6, 126,7+)	9/34 (26,5) [12,9, 44,4]	2/34 (5,9) [0,7, 19,7]	7,3 (3,7, 12,9)	>22 [#] (13,6,NE)
	1	5/18 (27,8) [9,7, 53,5]	56,1 (40,1, 76,1+)	4/18 (22,2) [6,4, 47,6]	1/18 (5,6) [0,1, 27,3]	4,7 (1,9, 10,9)	NR (17,9, NE)
	10	5/16 (31,3) [11,0, 58,7]	56,1 (36,6, 126,7+)	5/16 (31,3) [11,0, 58,7]	1/16 (6,3) [0,2, 30,2]	8,0 (3,7, 14,0)	18,8 (11,6, NE)

* Частоту объективных ответов ($\{[CR + PR] \div N\} \times 100$) рассчитывали на основе подтвержденных ответов с доверительными интервалами, рассчитанными с использованием способа Клоппер-Пирсона. Индивидуальные ответы пациентов были вынесены в RECIST v1.0 с модификацией (смотрите способы S1 и протокол исследования, NEJM.org).

† Время от первого ответа до времени задокументированной прогрессии, летального исхода или для подвергнутых цензуре данных (обозначенных "+"), время до последней оценки опухоли.

‡ NR, не достигнутый; момент времени, в который вероятность того, что прогресс отвечающих на лечение пациентов падает ниже 50%, не был достигнут из-за недостаточного количества событий и/или продолжения.

§ 1 CR был отмечен при меланоме и 1 CR при раке почки.

¶ У пяти пациентов с опухолевой прогрессией была эскалация дозы от 0,1 до 1,0 мг/кг, и шесть от 0,3 до 1,0 мг/кг. Ни один из этих пациентов не ответил на терапию.

Медиана общей выживаемости не была достигнута на 22 месяце, самый длинный времени до смерти до сих пор у пациентов с раком почки в этом клиническом исследовании.

^ NE, не оцениваемый

Пример 8

Корреляция между экспрессией мембранных PD-L1 и анти-PD-1 ответом

Окрашивание ИHC PD-L1 проводили на предварительно обработанных фиксированных в формалине заключенных в парафин (FFPE) опухолевых образцах с использованием мышиного моноклонального антитела 5H1 к PD-L1 человека (Dong *et al.*, 2002), в соответствии со стандартным протоколом ИHC (Taube *et al.*, 2012; сопровод. материалы). Вкратце, срезы FFPE толщиной 5 мкм, установленные на предметные стекла, депарафинизировали в ксилоле, и демаскировку антигена проводили с использованием буфера Трис-ЭДТА, pH 9,0 при 120°C в течение 10 мин в Decloaking Chamber (Biocare Medical). Эндогенную пероксидазу, биотин и белки (система CAS K1500, Dako, набор авидин/биотин блокирования, SP-2001, Vector Laboratories; Serotec Block ACE), и первичное антитело 5H1 добавляли в концентрации 2 мкг/мл и оставляли для инкубации при 4°C в течение 20 ч. Вторичное антитело (биотинилированное к мышиному IgG1, 553441 BD) наносили в концентрации 1 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре (RT). Сигнал затем разрабатывали с усилением в соответствии с протоколом производителя (система CAS K1500, Dako). Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином, обезвоживали в этаноле и очищали в ксилоле, и наносили покрывное стекло.

Процент опухолевых клеток, проявляющих окрашивание клеточной поверхности на PD-L1, оценивали два независимых патолога, которые не были осведомлены о результатах лечения. PD-L1 позитивность определяли в образце по 5% порогу экспрессии (Taube *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2006), а в случаях с несколькими образцами, если какой-либо образец отвечал этому критерию. Точный тест Фишера применяли, чтобы оценить связь между экспрессией PD-L1 и OR, отметив, однако, что этот анализ был основан частично на дополнительных биопсиях от не случайной подгруппы популяции, и тестирование статистических гипотез не было предварительно специфицировано.

Шестьдесят один предварительно обработанный опухолевый образец от 42 пациентов (18 MEL, 10 NSCLC, 7 CRC, 5 RCC и 2 CRPC) анализировали на экспрессию PD-L1 на поверхности опухолевых клеток (фиг. 8). Биоптаты от 25 из 42 пациентов были положительными на экспрессию PD-L1 с помощью ИHC. Точный тест Фишера применяли, чтобы оценить связь между экспрессиям PD-L1 и OR в ретроспективном анализе. Среди 42 пациентов с поверхностным PD-L1+, 9 (36%) достигали OR, тогда как среди 17 пациентов с PD-L1 опухолями ни один не достигал OR (фиг. 8A). Таким образом, в подгруппе пациентов с экспрессией PD-L1 на клеточной поверхности на опухолевых клетках в биопсиях с предварительной обработкой было связано с повышенной частотой OR среди

пациентов, получавших BMS-936558, в то время как ни один пациент с задокументированными PD-L1-отрицательными опухолями не испытывал ОР. Эти данные указывают на то, что экспрессия опухолевых PD-L1 представляет собой молекулярный маркер, который делает возможным отбор пациентов для анти-PD-1 иммунотерапии.

Пример 9

Выделение кроличьих моноклональных антител, которые обнаруживают мембранный антиген hPD-L1 в FFPE тканях

Кроличьи антитела против полипептида PD-L1 человека получали с помощью Epitomics, Inc. (Burlingame, CA) путем иммунизации кроликов с использованием рекомбинантного человеческого слитого белка PD-L1. Титры антисыворотки оценивали с использованием стандартного прямого анализа ELISA с антигеном hPD-L1, и клеточный ELISA с использованием трансфицированных клеток с гиперэкспрессией hPD-L1. Эти антитела также подвергали скринингу на их способность связываться с PD-L1 с помощью анализа ИНС срезов ткани FFPE. Кролика с самым высоким титром антител выбирали для спленэктомии. Лимфоциты, выделенные из селезенки, сливали с клетками миеломы в 40 x 96-луночных планшетах и подвергали скринингу с помощью ELISA против иммунизирующего антигена PD-L1 и с помощью клеточного анализа ELISA против клеток со сверхэкспрессией hPD-L1. Положительные клоны расширяли в 24-луночные планшеты, и подтверждающие скрины проводили путем прямого анализа ELISA и клеточного анализа ELISA. Супернатанты (supr) клонов, которые были специфичны к скринингу антигена, повторно подвергали скринингу с помощью ИНС.

Набор мышинных моноклональных антител к hPD-L1 также получали путем иммунизации мышей с использованием протокола, аналогичного описанному выше для моноклональных антител кролика.

Из в общей сложности 185 множественных подвергнутых скринингу клонов как от кроличьей, так и мышинной иммунизации, только десять кроличьих множественных клонов антител специфически обнаруживали мембранную форму hPD-L1. Ни один из очищенных субклонов мыши не обнаруживал специфически hPD-L1 на клеточной поверхности. Шестдесят субклонов от пяти лучших кроличьих множественных клонов (обозначенных № 13, 20, 28, 29 и 49, каждый из которых содержит 12 субклонов) подвергали первоначальному скринингу с помощью ИНС на тканевых микрочипах FFPE низкой плотности (ТМА), а затем путем подтверждения и проверки специфичности в суженных 25 субклонах. Кроличий IgG использовали в качестве отрицательного изотипического контроля, а моноклональное антитело 5H1 (Dong *et al.*, 2002) использовали в качестве

положительного контроля. Специфичность дополнительно проверяли с помощью преабсорбционного анализа антигенов. Через два раунда ИНС следующие 15 очищенных субклонов выбирали в качестве наиболее перспективных антител по специфичности и интенсивности окрашивания: 13-1, 13-3, 13-7, 13-8; 20-5, 20-7, 20-12, 20-6; 28-1, 28-8, 28-12; 29-8; 49-5, 49-7 и 49-9. Данные иммунореактивности по этим выбранным антителам суммированы в таблице 5.

Таблица 5. Иммунореактивность кроличьих моноклональных антител к hPD-L1

	Специфическое окрашивание		Неспецифическое окрашивание
Название антитела	Позитивн. к негатив. окраш-ю PD-L1 клеток*	Диапазон интенсивности на тканях [†] (очень высокая, высокая, средняя, низкая)	Фоновое окрашивание тканей (высокое, среднее, низкое)
13-1	Позитивное	От низкой до очень высокой	Нет
13-3	Позитивное	От низкой до высокой	Нет
13-7	Позитивное	От низкой до высокой	Нет
13-8	Позитивное	От низкой до высокой	Нет
20-5	Позитивное	От низкой до очень высокой	Высокое
20-6	Позитивное	От низкой до высокой	Среднее
20-7	Позитивное	От низкой до высокой	Среднее
20-12	Позитивное	От низкой до высокой	Среднее
28-1	Позитивное	От низкой до очень высокой	Нет
28-8	Позитивное	От средней до очень высокой	Нет
28-10	Позитивное	От средней до очень высокой	Низкое
28-12	Позитивное	От низкой до очень высокой	Нет
49-5	Позитивное	От низкой до высокой	Нет
49-7	Позитивное	От низкой до высокой	Низкое
49-9	Позитивное	От низкой до высокой	Нет
5H1	Позитивное	От высокой до очень высокой	Нет
Rb IgG	Негативное	Негативное	Нет

* PD-L1, стабильно трансфицированные клетки СНО против контрольных СНО-S;

† PD-L1-позитивные ткани включали в себя плаценту и один немелкоклеточный рака легкого; обнаружение экспрессии до "очень высокой" предполагает лучшую чувствительность при обнаружении мембранных PD-L1.

Дополнительные анализы проводили для дальнейшей характеристики очищенных клонов антитела, включая в себя определение аффинности связывания и перекрестную конкуренцию среди антител (для идентификации перекрытия, по сравнению с разными областями эпитопов) с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Все антитела проявляли высокую аффинность связывания ($K_D < 10^{-9}$ М). Эти 15 очищенных клонов также повторно подвергали скринингу с помощью ИНС на FFPE низкой плотности ТМА или обычных срезах в отношении различных типов клеток и тканей, которые известны как позитивные или негативные на экспрессию PD-L1 на клеточной поверхности. Кроличий IgG использовали в качестве изотипического контроля, а моноклональное антитело 5H1 использовали в качестве положительного контроля. При высокой концентрации (10 мкг/мл) клоны 28-х и 49-х отображали от низкого до умеренного уровня фонового окрашивания в тканях, в то время как клоны 13-х не обнаруживали фонового окрашивания, что свидетельствует о том, что 13-х клонов характеризуются широким динамическим диапазоном. Клоны 20-х отображали различную степень фонового окрашивания, которое было в первую очередь цитоплазматическим и диффузным. Клон с самым надежным специфическим обнаружением мембранного PD-L1, кроличий клон 28-8 ($K_D = 100$ пМ, как определено с помощью SPR), был выбран в качестве ведущего антитела для последующих анализов ИНС. Моноклональные антитела 28-1, 28-12, 20-12 и 29-8 характеризовались значением K_D 130 пМ, 94 пМ, 160 мкМ и 1200 мкМ, соответственно. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной области (V_K) легкой (каппа) цепи моноклонального антитела 28-8 приведены в SEQ ID NO: 35 и 36, соответственно. Было показано, что антитело 28-8 распознает различные эпитопы от мышинового моноклонального антитела 5H1, на основе анализа SPR. Клоны 28-1, 28-12, 29-8 и 20-12 были следующими лучшими антителами по надежности обнаружения мембранных PD-L1 в FFPE тканях. Хотя моноклональное антитело 13-1 характеризовалось лучшей специфичностью в отношении обнаружения мембранного PD-L1, максимальный уровень обнаружения был ниже, чем у других ведущих антител. Вестерн-блоттинг также выполняли с плюс/минус конкуренцией антигена для подтверждения специфичности выбранных антител в отношении PD-L1.

Сравнивали связывание моноклональных антител 5H1 и 28-8 с мембранным PD-L1 в исследуемых образцах тканей FFPE, содержащих опухолевые клетки и проникающие в опухоль воспалительные клетки из разных типов опухолей. Мембранную экспрессию PD-L1 оценивали с использованием способа гистологического счета, выполненного 2

независимыми патологами. Четыре NSCLC, 2 MEL и 2 RCC опухоли окрашивали с28-8 по 2 мг/мл и 5H1 по 5 мг/мл. Данные приведены в таблице 6, и графически показаны на фиг. 9. Кроличье моноклональное антитело 28-8 показало лучшее обнаружение (более высокие показатели гистологического счета) для 7 из 10 образцов с использованием в 2,5 раза меньшего количества антитела, и только в одном образце был показатель гистологического счета для 5H1 немного выше, чем для моноклонального антитела 28-8.

Таблица 6. Сравнение моноклональных антител 28-8 и 5H1 путем анализа гистологического счета

Ткань	Номер образца	Средний показатель гистологического счета (5H1)	Средний показатель гистологического счета (28-8)
NSCLC	1080754B	245	261
NSCLC	1080766B	103	130
NSCLC	1080790	40	37
NSCLC	1080993B	12	16
Mel	T030668	98	113
Mel	T980744	98	123
Mel	1168657B	0	0
Mel	T980747	1	9
RCC	1164619B	4	4
RCC	1167809B	108	125

Taube с соавт. (2012) показали с помощью проточной цитометрии на культивируемых клетках, что моноклональное антитело 5H1 связывалось с клеточной поверхностью, и специфичность связывания с PD-L1 подтверждали с использованием слитого белка PD-L1 для конкурентного блокирования связывания моноклонального антитела 5H1 с срезами тканей. Эти авторы также сравнивали 5H1 с кроличьим поликлональным антителом к HPD-L1, 4059, ранее описанным Gadiot с соавт. (2011), и обнаружили, что в то время как 5H1 показывал паттерн окрашивания клеточной поверхности на образцах FFPE, поликлональное антитело 4059 продемонстрировало диффузное окрашивание цитоплазмы. Кроме того, когда 5H1 сравнивали с поликлональным антителом 4059 с помощью анализа Вестерн-блоттинг, антитело 4059 связывалось с несколькими белками в лизатах клеток

меланомы в дополнение к белку 50 кДа, соответствующего ожидаемой массе гликозилированного PD-L1, в отличие от 5H1, который специфически обнаруживал полосу 50 кДа гликозилированного PD-L1 (Taube *et al.*, 2012). В отличие от результатов Taube с соавт. (2012) и описанных в настоящем документе результаты (суммированы в таблице 7), Gadiot с соавт. (2011) сообщили, что моноклональное антитело 5H1 производило высокий уровень фоновое окрашивания в образцах FFPE тканей, в то время как они обнаружили, что поликлональное антитело 4059 производило удовлетворительное специфическое окрашивание PD-L1 в образцах FFPE. Тринадцать других антител, исследованных Gadiot с соавт. (2011), либо не окрашивали FFPE ткани, давая высокое фоновое окрашивание, либо не блокировались конкуренцией слитого белка PD-L1, подчеркивая трудности в получении антител к PD-L1, которые специфически связываются с PD-L1 в FFPE тканях.

В настоящем исследовании автоматизированный анализ ИНС (смотрите пример 10) использовали для оценки связывания нескольких коммерчески доступных антител к PD-L1 и 5H1 (Dong *et al.*, 2002) с образцами FFPE ткани, содержащими различные клетки, экспрессирующие PD-L1. Результаты, суммированные в таблице 7, показывают, что ни один из исследованных коммерчески доступных антител специфически не распознают экспрессию мембранных PD-L1 в тканях человека, известные как экспрессирующие PD-L1, или четко различают клетки CHO, экспрессирующие PD-L1, по сравнению с нетрансфицированными исходными клетками CHO, которые не экспрессируют PD-L1. Неспособность поликлонального антитела (pAb) 4059 специфически связываться с распознанным мембранным PD-L1 согласуется с выводами Taube с соавт. (2012). Связывание 28-8 было таким же, как 5H1 в этом анализе, тем не менее анализ гистологического счета показывает, что 28-8 работает лучше, чем 5H1.

Таблица 7. Связывание моноклональных антител с образцами FFPE, содержащими экспрессирующие PD-L1-клетки

Источник	Типы антител	№ клона (моноклон. антитело) /№ в каталоге (поликлон. антитело)	Позит. против негат. окраш-е клеток PD-L1*	Позитивные ткани человека [†]
MBL	моноклон. антитело	27A2	Провалено	Провалено
BioLegend	моноклон. антитело	29E.2A3	Провалено	Провалено

Источник	Типы антител	№ клона (моноклон. антитело) /№ в каталоге (поликлон. антитело)	Позит. против негат. окраш-е клеток PD-L1*	Позитивные ткани человека [†]
eBiosciences	моноклон. антитело	M1H1	Нет окраш-я	Нет окраш-я
Collaborator	моноклон. антитело	5H1	Пройдено	Пройдено
ProSci	поликлон. антитело	4059	Провалено	Провалено
LifeSpan BioSciences	поликлон. антитело	LS-B480/0604	Провалено	Провалено
Bristol-Myers Squibb	моноклон. антитело	28-8	Пройдено	Пройдено

*PD-L1, стабильно трансфицированные клетки CHO против исходного отрицательного контроля CHO-S;

[†] PD-L1-положительные ткани, включенные в миндалины и/или тимус;

Моноклон. антитело, мышинное моноклональное антитело; поликлон. антитело, кроличье поликлональное антитело.

Пример 10

Разработка протокола автоматизированной ИНС для оценки экспрессии PD-L1

Протокол автоматизированной ИНС разрабатывали для анализа экспрессии PD-L1 в FFPE образцах. Срезы тканей (4 мкм) устанавливали на стекла, депарафинизировали в autostainer (Leica) путем замачивания дважды в течение 5 мин в ксилоле и повторно гидратировали путем замачивания дважды по 2 мин каждый раз в 100% этаноле, дважды в 95% (об/об) этаноле, один раз в 70% (об/об) этаноле и один раз в деионизованной воде (dH₂O). Демаскировку антигена проводили с использованием decloaking chamber (Biocare Medical Decloaking Chamber Plus) и буфера Dako pH 6, нагретым до 110°C (P1) в течение 10 мин, а затем переходили к следующей стадии (P2 включенный вентилятор при 98°C; выключенный вентилятор при 90°C). Предметные стекла охлаждали при комнатной температуре (RT) в течение 15 мин и промывали водой в течение приблизительно 1 мин. Реагенты устанавливали на автостейнер (BioGenex i6000), и область ткани определяли с использованием пап ручки. Анализ ИНС, проходящий с использованием автостейнера в

режиме исследования, содержит следующие стадии: нейтрализацию эндогенной пероксидазы с использованием блока пероксидазы (Leica) в течение 10 мин, с последующей промывкой 3 раза промывочным буфером ИНС (Dako); применение блока белка (Leica) к стеклам и инкубирование в течение 10 мин при комнатной температуре, с последующим промыванием 3 раза промывочным буфером; применение первичного антитела к стеклам (2 мкг/мл) и инкубирование в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим промыванием 6 раз промывочным буфером; добавление вторичного блока (NovoLink Kit) к стеклам и инкубирование в течение 30 мин с последующей промывкой 6 раз промывочным буфером; добавление полимера NovoLink (NovoLink Kit) к стеклам и инкубирование в течение 30 мин с последующим промыванием 6 раз промывочным буфером; добавление субстратов хромогена DAB (NovoLink Kit) и развитие в течение 3 мин, с последующим ополаскиванием 5 раз с dH₂O при комнатной температуре; контрастное окрашивание гематоксилином (NovoLink Kit) в течение 1 мин при комнатной температуре с последующим промыванием по 3 раза dH₂O 5 раз при комнатной температуре. Первичное антитело выбирали из кроличьих антител к PD-L1, показанных в таблице 4; моноклональное антитело 28-8 было предпочтительным антителом. В качестве отрицательного контроля использовали IgG кролика (Dako). Срезы тканей дегидратировали с использованием автостейнера Leica путем промывания один раз в течение 2 мин в 70% этаноле, дважды в течение 2 мин в 95% этанол и трижды в течение 2 мин в 70% этаноле, затем очищали промыванием три раза в течение 5 мин в ксилоле. Срезы постоянно устанавливали на предметное стекло с пермаунтом, покрытое покровным стеклом и переносили в химический колпак для высушивания.

Пример 11

Дизайн фазы 1 клинического исследования по антителу к PD-L1

Дизайн исследования

Фазу 1 исследования проводили с целью оценки безопасности и переносимости BMS-936559 (также называемым в настоящем документе и в патенте США № 7943743 как 12A4) у пациентов с выбранными прогрессирующими солидными опухолями. Вторичные цели включали в себя первоначальную оценку противоопухолевой активности BMS-936559 и фармакокинетическую оценку. Фармакологические измерения были включены в поисковые задачи. Пациентов лечили в 6-недельных циклах BMS-936559, вводимых в виде 60-минутной внутривенной инфузии каждые 2 недели в дни 1, 15 и 29 из каждого цикла. Пациенты продолжали лечение до 16 циклов, если они не испытали неприемлемой токсичности, прогрессирования заболевания или отзывали свое согласие. У некоторых

пациентов, которые были клинически стабильными, лечение за начальным прогрессированием заболевания было разрешено до тех пор, пока дальнейшее прогрессирование не было подтверждено.

Повышение дозы

Пациенты с прогрессирующими NSCLC, MEL, CRC, RCC, карциномой яичников (OV), желудка (GC), молочной железы (BC) и поджелудочной железы (PC) имели право быть включены в клиническое исследование. Используя дизайн ускоренного титрования, безопасность оценивали при дозах 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг. Одного пациента зачисляли в каждую последующую когорту, пока АЕ не составлял ≥ 2 степени тяжести во время цикла 1. Два дополнительных пациента затем поступили на этом уровне дозы, и исследование перешло к стандартному дизайну 3 + 3. Повышение или снижение дозы у одного и того же пациента не допускалось. Максимально переносимую дозу (MTD) определяли как наиболее высокую дозу, при которой менее чем одна треть пациентов характеризовалась дозолимитирующей токсичностью.

Когорта расширение

Первоначально 5 расширенных когорт ($n = 16/\text{когорта}$) были зачислены на 10 мг/кг для пациентов с NSCLC, MEL, RCC, OV и CRC. На основании исходных сигналов активности, дополнительные расширенные когорты (до $n = 16/\text{когорта}$) были зарегистрированы для MEL (на 1,0 и 3,0 мг/кг), NSCLC (когорты с плоскоклеточной или неплоскоклеточной гистологией, рандомизированные на 1, 3 или 10 мг/кг) и на 10 мг/кг для PC, BC и GC.

Пациенты

Пациенты должны были характеризоваться наличием задокументированных NSCLC, MEL, RCC, OV, CRC, PC, GC или BC и по меньшей мере одним неудачным предшествующим курсом соответствующей опухолевой терапии для прогрессирующего/метастатического заболевания (за исключением пациентов с PC или GC, которые могли быть нелеченными). Другие критерии включения включали в себя возраст ≥ 18 лет, ожидаемую продолжительность жизни ≥ 12 недель, показатель общего состояния согласно Восточной объединенной онкологической группе ≤ 2 , измеримое заболевание, как определено RECIST v1.0 и адекватные гематологические, печеночные и почечные функции. Пациентам с подвергнутыми лечению метастазами в головной мозг было разрешено участвовать, если они были стабильны в течение по меньшей мере 8 недель. Основные критерии исключения включали в себя историю аутоиммунного заболевания или другие заболевания, требующих системных стероидов или иммуносупрессоров, до лечения с модулирующими Т-клетки антителами (включающие в себя к PD-1, к PD-L1 и к CTLA-4), истории ВИЧ или активного гепатита В или С.

В настоящем текущем исследовании 207 пациентов с NSCLC (n = 75), MEL (n = 55), CRC (n = 18), RCC (n = 17), OV (n = 17), PC (n = 14), GC (n = 7) или BC (n = 4) получали BMS-936559 в течение 34-месячного периода и были включены в данные по безопасности. Эффективность характеризовалась у 160 поддающихся оценке ответа пациентов. Исходные демографические характеристики общей и поддающийся оценке ответа популяций пациентов были очень похожи (Brahmer *et al.*, 2012). Среди подвергнутых лечению пациентов 86% ранее получали химиотерапию и 28% иммунологическую и биологическую терапию. Предшествующее лечение по типу опухоли включало в себя иммунотерапию (56%) и ингибитор B-RAF (9%) у пациентов с MEL; основанную на платине химиотерапию (95%) и ингибиторы тирозинкиназы (TKI; 41%) у пациентов с NSCLC; и нефрэктомия (94%), антиангиогенную терапию (82%) и иммунотерапию (41%) у пациентов с RCC (смотрите Brahmer *et al.*, 2012, для более подробной информации по предварительному лечению пациентов).

Статистический анализ

Все 207 пациентов, начинающие лечение по состоянию на дату анализа, были использованы для резюме исходных характеристик и АЕ. Популяция эффективности состояла из 160 пациентов с поддающимися оценке ответами, начавших лечение по меньшей мере за 7 месяцев до даты анализа. АЕ были закодированы с использованием MedDRA v14.1. Индивидуальные лучшие общие ответы получали от измерений рентгенологическим сканированием в соответствии с модифицированной RECIST v1.0. OR подтверждали по меньшей мере одной последовательной оценкой опухоли. Дополнительные подробности, касающиеся статистических способов, представлены в Brahmer *et al.* (2012).

Пример 12

Оценки безопасности на пациентах, получавших антитело к PD-L1

Оценки безопасности (клиническое обследование и лабораторные исследования) проводили на всех пациентах в начале исследования и регулярно (еженедельно в течение цикла 1 и два раза в неделю после этого). Тяжесть АЕ оценивали на основе NCI CTCAE, v3.0. Оценку заболевания с помощью компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии выполняли в начале и до каждого цикла лечения.

МТД не достигло самой высокой исследуемой дозы 10 мг/кг BMS-936559. Средняя продолжительность терапии составила 12 недель (диапазон 2,0-111,1 недель). Относительная интенсивность дозы $\geq 90\%$ была достигнута у 86% пациентов. Двенадцать

из 207 пациентов (6%) прекратили лечение из-за связанного с BMS-936559 АЕ (смотрите Brahmer *et al.*, 2012, для более подробной информации).

АЕ, независимо от причинности (любой степени тяжести), были зарегистрированы у 188 из 207 пациентов. Оцененные исследователем связанные с BMS-936559 АЕ отмечали у 126 из 207 (61%) пациентов. Наиболее распространенными связанными с лекарственными средствами АЕ были усталость, инфузионные реакции, диарея, боль в суставах, сыпь, тошнота, зуд и головная боль. Большинство явлений характеризовались низкой степенью тяжести со связанной с BMS-936559 3-4 степенью тяжести, указанной у 19 из 207 (9%) пациентов (Brahmer *et al.*, 2012). Спектр, частота и тяжесть связанных с BMS-936559 АЕ были похожи по уровням доз, за исключением инфузионных реакций. Связанные с лекарственными средствами АЕОСИ с потенциальной связанной с иммунной системой этиологией были обнаружены у 81 из 207 (39%) пациентов и включали в себя сыпь, гипотиреоз, гепатит и единичные случаи каждого из саркоидоза, эндофтальмита, сахарного диабета и миастении (Brahmer *et al.*, 2012). Эти АЕ были преимущественно 1-2 степени тяжести и обычно обратимы с прерыванием лечения или прекращением приема препарата. Примечательно, что 9 пациентов получали лечение кортикостероидами для управления АЕ. АЕ улучшились или разрешились у всех пациентов. Кроме того, 4 из этих 9 пациентов сохраняли контроль над заболеванием, несмотря на лечение кортикостероидами. На эндокринные АЕ воздействовали заместительной терапией, и пациенты возобновляли лечение BMS-936559 по усмотрению лечащего врача. Инфузионные реакции наблюдались у 21 из 207 (10%) пациентов, преимущественно в дозе 10 мг/кг. Они были 1-2 степени тяжести, за исключением одного случая 3 степени тяжести при 10 мг/кг. Инфузионные реакции были, как правило, быстро обратимы с антигистаминными и жаропонижающими средствами, а в некоторых случаях, кортикостероидами. Профилактическая схема лечения с антигистаминными и жаропонижающими препаратами была реализована в ходе исследования. Пациенты с 1-2 степенями тяжести инфузионных реакций смогли продолжить лечение с BMS-936559 с профилактическими антигистаминными и жаропонижающими средствами и при пониженной скорости инфузии. Связанные с BMS-936559 серьезные АЕ происходили у 11 из 207 (5%) пациентов. По состоянию на дату анализа данных, 45 пациентов (22%) умерли (Brahmer *et al.*, 2012); не наблюдалось ни одного случая смерти, связанного с лекарственными средствами.

Пример 13

Анализы фармакокинетики/фармакодинамики антитела к PD-L1

Для анализа ФК собирали серийные образцы крови, и концентрации в сыворотке BMS-936559 количественно определяли с помощью ELISA. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли от пациентов на исходном уровне и после одного цикла лечения для анализа RO PD-L1 с помощью BMS-936559 на циркулирующих CD3-позитивных Т-клетках с помощью проточной цитометрии (Brahmer *et al.*, 2010).

Концентрации BMS-936559 в сыворотке увеличивались в зависимости от дозы от 1-10 мг/кг ($n = 131$). Средняя геометрическая площадь под кривой (0-14 дней) для 1, 3 и 10 мг/кг уровней доз составляла 2210, 7750 и 36620 мкг/мл•ч (коэффициент вариации [CV] 34-59%), соответственно; геометрические средние пиковые концентрации в этих дозах составляли 27, 83 и 272 мкг/мл (CV 30-34%), соответственно, после первой дозы. Период полужизни BMS-936559 оценивали от популяционных фармакокинетических данных, как приблизительно 15 дней. RO PD-L1 на CD3-позитивных лимфоцитах периферической крови оценивали у 29 пациентов с MEL в конце цикла 1 лечения, в дозах BMS-936559 от 1-10 мг/кг. Медиана RO превышала 65% для всех групп (Brahmer *et al.*, 2012).

Пример 14

Противоопухолевая эффективность, проявляемая антителом к PD-L1

Сто шестьдесят пациентов из 207 подвергнутых лечению оценивали на ответ в феврале 2012 г. и включали пациентов с NSCLC, MEL, CRC, RCC, OV и PC, но не пациентов с GC или BC. Клиническая активность наблюдалась при всех дозах ≥ 1 мг/кг (Brahmer *et al.*, 2012). OR (подтвержденный полный [CR] или частичный [PR] ответы) наблюдались у пациентов с MEL, NSCLC, RCC, OV (таблица 8), как показано на репрезентативных спайдер-диаграммах и КТ (фиг. 10-13), и многие OR также были прочными (таблица 9). Четыре дополнительных пациента характеризовались стойким снижением повреждений мишеней в присутствии новых поражений, в соответствии со "связанными с иммунной системой" паттернами ответов; однако, для целей расчета доли ответов, они не были классифицированы как отвечающие на лечение. Противоопухолевые ответы и/или длительное стабильное заболевание (SD) наблюдались у пациентов с различными предшествующими полученными курсами лечения. OR были обнаружены даже у пациентов с обширным бременем метастатического заболевания.

У пациентов с MEL были 9 OR во всех уровнях доз 1, 3 и 10 мг/кг с частотой отклика 6%, 29% и 19%, соответственно. Три пациента с MEL достигли CR. Все 9 пациентов с MEL, которые испытали OR, начали лечение ≥ 1 года до анализа данных; из них 5 характеризовались длительностью отклика ≥ 1 год. Кроме того, 14 пациентов с MEL (27%) характеризовались SD длительностью ≥ 24 недель. У пациентов с NSCLC было 5 OR среди

уровней доз 3 и 10 мг/кг, с частотой отклика 8% и 16%, соответственно. Наблюдались OR у пациентов с неплоскоклеточной (n=4) или плоскоклеточной гистологией (n=1). Все 5 отвечающих на лечение пациентов с NSCLC начали лечение ≥ 24 недель до анализа данных; из них 3 характеризовались наличием ответов продолжительностью ≥ 24 недель. Шесть дополнительных пациентов с NSCLC характеризовались наличием SD длительностью ≥ 24 недель. Наблюдался 1 PR из 17 пациентов с OV (частота отклика 6%) и 3 пациента (18%) с SD длительностью ≥ 24 недель, все на 10 мг/кг. У пациентов с RCC были OR у 2 из 17 (12%) пациентов, получавших 10 мг/кг, с ответами продолжительностью 4 и 18 месяцев, соответственно. Семь дополнительных пациентов с RCC характеризовались SD длительностью ≥ 24 недель.

Таблица 8. Клиническая активность BMS-936559 у 160 поддающихся оценке ответа пациентов*

Тип опухоли	Доза (мг/кг)	n	ORR [§] Кол-во пациентов (%) [95% CI]	SD ≥ 24 нед. Кол-во пациентов (%) [95% CI]	PFSR** в 24 нед. (%) [95% CI]
MEL	0,3	1	0 [0-98]	0 [0-98]	N/A
	1	18	1 (6) [0,1-27]	6 (33) [13-59]	39 [16-61]
	3	17	5 (29) [†] [10-56]	3 (18) [4-43]	47 [21-72]
	10	16	3 (19) ^{††} [4-46]	5 (31) [11-59]	44 [19-68]
Все MEL		52	9 (17) (8-30)	14 (27) [16-41]	42 [28-56]
NSCLC [§]	1	11	0 [0-29]	0 [0-29]	N/A
Плоскоклеточный	1	1	0 [0-98]	0 [0-98]	N/A
Неплоскоклеточный	1	10	0 [0-31]	0 [0-31]	N/A
	3	13	1 (8) [0,2-36]	1 (8) [0,2-36]	34 [7-60]
Плоскоклеточный	3	4	0 [0-60]	1 (25) [0,6-81]	50 [1-99]
Неплоскоклеточный	3	9	1 (11) [0,3-48]	0 [0-34]	25 [0-55]
	10	25	4 (16) [5-36]	5 (20) [7-41]	46 [25-67]
Плоскоклеточный	10	8	1 (13) [0,3-53]	2 (25) [3-65]	47 [10-83]
Неплоскоклеточный	10	17	3 (18) [4-43]	3 (18) [4-43]	46 [20-72]
Все NCSLC		49	5 (10) [3-22]	6 (12) [5-25]	31 [17-45]
Все плоскоклет,		13	1 (8) [0,2-36]	3 (23,1) [5-54]	43 [15-71]
Все неплоскоклет,		36	4 (11) [3-26]	3 (8) [2-23]	26 [10-42]

Тип опухоли	Доза (мг/кг)	n	ORR [§] Кол-во пациентов (%) [95% CI]	SD ≥ 24 нед. Кол-во пациентов (%) [95% CI]	PFSR ^{**} в 24 нед. (%) [95% CI]
OV	3	1	0 [0-98]	0 [0-98]	N/A
	10	16	1 (6) [0,2-30]	3 (19) [4-46]	25 [4-46]
Все OV		17	1 (6) [0,1-29]	3 (18) [4-43]	22 [2-43]
RCC	10	17	2 (12) [2-36]	7 (41) [18-67]	53 [29-77]

CI обозначает доверительные интервалы, MEL меланома, RCC почечно-клеточная карцинома, NSCLC немелкоклеточный рак легкого, OV рак яичников, RCC почечно-клеточная карцинома, N/A не применимо, ORR частота объективного ответа (полный ответ + частичный ответ), SD стабильное заболевание и PFSR выживаемость без прогрессирования.

* Популяция эффективности состоит из пациентов с поддающимся оценке ответом, начавших лечение по меньшей мере за 7 месяцев до даты анализа и характеризующихся наличием измеримого заболевания на базовой оценке опухоли и по меньшей мере одним из следующего: оценкой опухоли в исследовании, клиническим прогрессированием или смертью.

† Включает в себя два CR.

†† Включает в себя один CR.

§ Частота объективных ответов ($\{[CR + PR] \div n\} \times 100$) основана только на подтвержденных ответах с доверительными интервалами, рассчитанными с использованием способа Клоппера-Пирсона.

** Уровень выживаемости без прогрессирования составлял долю пациентов, которые не прогрессировали и были живы в течение 24 недель, рассчитанных по методологии Каплана-Мейера с доверительными интервалами с использованием способа Greenwood.

Индивидуальные ответы пациентов были вынесены за RECIST v1.0 с модификацией (смотрите протокол исследования в Brahmer *et al.* (2012) *N Engl J Med* (представленный) для получения дополнительной информации).

Таблица 9. Продолжительность объективных ответов на BMS-936559*

Тип опухоли	Доза (мг/кг)	Кол-во пациентов с OR	Продолжительность ответа (месяцы) [†]
MEL	1	1	6,9
	3	5	23,5+, 22,9+, 16,2+, 4,1+, 3,5
	10	4	24,6+, 23,9+, 18,0+, 17,0
NSCLC	1	0	9,2+
	3	1	2,3+
	10	4	16,6+, 12,6+, 9,8, 3,5
RCC	10	2	18, 4
OV	10	1	1,3+

* MEL обозначает меланому, NSCLC немелкоклеточный рак легкого, RCC почечно-клеточный рак, OV рака яичников.

[†] Время от первого ответа до времени задокументированной прогрессии, смерти или подвергнутых цензуре данных (обозначается +), время до последней оценки опухоли.

Пример 15

Дизайн фазы 1 клинического исследования по анти-PD-1 плюс анти-CTLA-4 при прогрессирующей MEL

Дизайн исследования

В этой фазе 1 исследования последующие когорты пациентов лечили увеличивающимися дозами внутривенного ниволумаба и ипилимумаба, вводимыми одновременно (одновременная схема лечения) и отдельно, две когорты пациентов, получавших ранее ипилимумаб, получали только ниволумаб (последовательная схема лечения).

Для одновременной схемы лечения пациенты получали в течение индукционного периода ниволумаб и ипилимумаб каждые 3 недели в течение 4 доз, а затем только ниволумаб каждые 3 недели в течение 4 доз. Комбинированное лечение впоследствии продолжалось в период поддерживающей терапии каждые 12 недель в течение до 8 доз. Когда оба препарата вводили вместе, ниволумаб вводили в первую очередь. В когорте дозы ниволумаба и ипилимумаба оставляли постоянными в течение периодов индукции и поддержания. Период оценки дозолимитирующей токсичности был на 9 неделе. Оценивание опухолей происходило на неделях 12, 18, 24 и 36, а затем каждые 12 недель после этого.

В последовательном режиме пациенты, ранее получавшие ипилимумаб до включения в исследование, получали ниволумаб каждые 2 недели в течение до 48 доз. Терапию с ниволумабом начинали в течение 4-12 недель после монотерапии с ипилимумабом. Оценки опухолей проводили на 8-й неделе, а затем каждые 8 недель после этого. Ответы опухолей на лечение устанавливали с использованием mWHO и связанных с иммунной системой критериев mWHO для обеих схем лечения.

После завершения терапии пациенты без подтвержденного прогрессирования заболевания продолжали до 2,5 лет. Пациенты с CR, PR или $SD \geq 24$ недель и последующим прогрессированием заболевания могли быть повторно подвергнуты лечению с оригинальной схемой лечения. Оценку безопасности проводили в соответствии с протоколом. Тяжесть АЕ оценивали в соответствии с общей терминологией критериев оценки нежелательных явлений Национального института онкологии, версия 3.0. Оценку заболевания с использованием КТ и/или МРТ при необходимости проводили в соответствии с протоколом.

Повышение дозы и расширение когорты

Исследование изначально планировалось для оценки одновременной схемы лечения с использованием стандартного дизайна 3 + 3 для фазы повышения дозы, с последующим расширением когорты в общей сложности до 16 пациентов в максимально переносимой дозе или максимальной введенной дозе. Период оценки дозолимитирующей токсичности (DLT) для повышения дозы составлял 9 недель. Повышение дозы для отдельного пациента не допускалось, и пациенты, у которых наблюдалась DLT, были отстранены от терапии. Пациенты, которые вышли из исследования в течение периода оценки DLT по другим, отличным от связанной с лекарственными средствами токсичности, причинам могли быть заменены. Протокол был изменен, чтобы позволить расширение любой когорты с одновременной схемой лечения во время повышения дозы для N = до 12 пациентов. Две когорты с последовательной схемой лечения одной (от 6 до 16 пациентов в каждой) были добавлены позже; пациенты получали ниволумаб (1 мг/кг или 3 мг/кг) после предварительного получения ипилимумаба.

Пациенты

В исследование включали пациентов в возрасте 18 лет и с диагнозом измеримой, неоперабельной стадии III или IV меланомы; показателем общего состояния согласно Восточной объединенной онкологической группы 0-1, где 0 означает бессимптомное и 1 умеренное симптоматическое; адекватной функцией органов и продолжительностью жизни ≥ 4 месяцев. Пациенты с активными, не поддающимися лечению метастазами центральной нервной системы; историей аутоиммунных заболеваний; предшествующей терапией с

модулирующими Т-клетки антителами (за исключением ипилимумаба для когорты с последовательной схемой лечения); ВИЧ или гепатитом В или С, были исключены.

В когорте с последовательной схемой лечения пациенты должны были получать 3 предшествующие дозы ипилимумаба, с последней введенной дозой в течение 4-12 недель от начала ниволумаба. Пациенты с CR, прогрессией с признаками клинического ухудшения или историей АЕ высокой степени тяжести, связанной с ипилимумабом, были исключены (смотрите Wolchok *et al.* 2013a, для подробностей протокола).

Восемьдесят шесть пациентов лечили в период с декабря 2009 г. по февраль 2013 г., 53 с одновременной схемой лечения и 33 с последовательной схемой лечения. Исходные характеристики пациентов подробно описаны в Wolchok *et al.* (2013a). В одновременной и последовательной схемах лечения 38% и 100% пациентов, соответственно, получали предшествующую системную терапию. Большинство пациентов характеризовались наличием заболевания М1с и > 30% характеризовались повышенным уровнем лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Большинство пациентов, включенных в когорты последовательной схемы лечения, продемонстрировали рентгенографическое прогрессирование (73%) с предварительным лечением с ипилимумабом.

Иммуногистохимия PD-L1

Экспрессию PD-L1 до воздействия измеряли с помощью ИНС в опухолевых образцах FFPE с использованием кроличьего моноклонального антитела к PD-L1, 28-8, и автоматизированного анализа, разработанного Dako (Carpinteria, CA). Специфичность антитела оценивали путем вестерн-блоттинга против рекомбинантного белка PD-L1 и лизатов из экспрессирующих и не экспрессирующих PD-L1 клеточных линий. Выполняли анализ ИНС с и без конкуренции антигена и оценку паттернов окрашивания в нормальных тканях человека. Проверяли аналитическую чувствительность, специфичность, воспроизводимость, повторяемость и надежность в иммуногистохимическом анализе и выполняли все предварительно определенные критерии приемлемости. Два патолога, не зная результаты, независимо читали и устанавливали баллы для всех клинических образцов. Образец определяли как PD-L1-положительный, если 5% опухолевых клеток проявляли окрашивание мембранных PD-L1 любой интенсивности в срезе с 100 подвергнутыми анализу клетками.

Статистический анализ

Все пациенты (N=86) по состоянию на февраль 2013 г. использовались для описания базовых характеристик, безопасности и абсолютного количества лимфоцитов (ALC), а также анализа окрашивания PD-L1. Популяция эффективности состояла из 82 пациентов с поддающимися оценке ответами, которые получили по меньшей мере одну дозу

исследуемой терапии, характеризовались наличием измеримого заболевания исходно и одним из следующих: оценкой опухоли в ходе лечения > 1 , клиническим прогрессированием или смертью до первой оценки опухоли в ходе лечения. АЕ были закодированы с использованием MedDRA, версия 15.1. Выбранные АЕ с потенциальными иммунологическими этиологиями определяли с использованием заранее определенного списка терминов MedDRA. Лучшие общие ответы получали программно из опухолевых измерений, предусмотренных исследовательским сайтом рентгенолога и исследователями в модифицированной WHO (mWHO) или связанных с иммунной системой критериев ответа (Wolchok *et al.* 2009). Полные и частичные ответы подтверждали по меньшей мере одной последующей оценкой опухоли. Анализ также проводили для оценки масштабов сокращения поражений-мишеней радиографической оценкой. Ответ характеризовали как глубокий, если была отмечена редукция на 80%, по сравнению с базовыми показателями. Неподтвержденные ответы по состоянию на дату настоящего анализа также включали в оценку совокупной клинической активности.

Пример 16

Оценки безопасности на пациентах с MEL, получавших анти-PD-1 плюс анти-CTLA-4

Для одновременной схемы лечения (n=53) АЕ любой степени тяжести, независимо от определения, наблюдались у 98% пациентов. Связанные с лечением АЕ наблюдались у 93% пациентов, наиболее распространенные из которых представляют собой сыпь (55%), зуд (47%), усталость (38%) и диарею (34%). АЕ 3-4 степени тяжести, независимо от определения, наблюдались у 72% пациентов, в то время как 3-4 степень тяжести связанных с лечением явлений отмечалась у 53%, при этом наиболее распространенные из которых представляют собой повышение липазы (13%), аспартатаминотрансферазы (13 %) и аланинаминотрансферазы (11%). Шесть из 28 (21%) пациентов характеризовались степенью тяжести 3-4 дозолимитирующих связанных с лечением событий. Связанные с лечением серьезные АЕ были зарегистрированы у 49% больных. Общие связанные с лечением выбранные АЕ 3-4 степени тяжести включали в себя печеночные (15%), желудочно-кишечного тракта (9%) и почечные (6%) события. Единичные случаи пневмонии и увеита наблюдались, в соответствии с историческим опытом монотерапии. Одиннадцать (21%) пациентов прекратили участие из-за связанных с лечением АЕ.

Когорта 3 (3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб) превысила MTD (3 из 6 пациентов испытывали бессимптомное повышение липазы 3-4 степени тяжести, которое сохранялось в течение 3 недель). Когорта 2 (1 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб)

идентифицировалась как MTD (увеит 3 степени тяжести, повышенные АСТ/АЛТ 3 степени тяжести у 1 пациента в каждой).

Для последовательной схемы лечения (n=33) АЕ любой степени тяжести, независимо от определения, наблюдались у 29 (88%) пациентов. Связанные с лечением АЕ наблюдались у 24 (73%) больных, причем наиболее общие включали в себя зуд (18%) и повышение липазы (12%). АЕ 3-4 степени тяжести, независимо от определения, наблюдались у 11 (33%) пациентов, в то время как связанные с лечением АЕ 3-4 степени тяжести наблюдались у 6 (18%) пациентов с повышением липазы как наиболее общим явлением (6%). Связанные с лечением серьезные АЕ были зарегистрированы у 7 (21%) пациентов. Эндокринные явления 3-4 степени тяжести отмечались как связанные с лечением отдельные АЕ у 2 пациентов. Один пациент характеризовался наличием пневмонита 2 степени тяжести. Три (9%) пациента прекратили участие из-за связанных с лечением АЕ.

Как для одновременных, так и последовательных схем лечения связанные с лечением АЕ были управляемыми и, как правило, обратимыми с иммунодепрессантами и/или заместительной терапией (для эндокринопатий) в более ранних алгоритмах, ранее установленных для ипилимумаба (смотрите листок-вкладыш YERVOY®). Среди 86 пациентов, получавших лечение в исследовании, 28 из 73 пациентов (38%) со связанными с лекарственными средствами нежелательными явлениями, требующие сдерживания системными глюкокортикоидами. Три пациента требовали дополнительной иммуносупрессивной терапии инфликсимабом (2 пациента) или микофенолятмофетиллом (1 пациент). Не было отмечено связанных с лечением смертей. Дополнительные сведения о АЕ и их сдерживания приведены в (Wolchok *et al.* 2013a).

Пример 17

Эффективность, проявляемая с помощью комбинации анти-PD-1 и анти-CTLA-4 у пациентов с MEL

Клиническая активность наблюдалась как с одновременными, так и последовательными схемами лечения (таблицы 10 и 11). В когортах одновременной схемы лечения, подтвержденные объективные ответы (или) критерии mWHO, наблюдались у 21 из 52 (40%; 95% CI: 27-55) пациентов с поддающимся оценке ответом во всех дозах. После отмеченных нескольких пациентов, которые продемонстрировали основные ответы (приближающийся к CR), оценивали число пациентов по меньшей мере с 80% уменьшением опухоли, эмпирический порог, выбранный потому, что представляет собой уровень регрессии опухоли, который приближается к полному ответу. Эта глубина ответа было редкостью в опубликованных исследованиях блокады контрольной точки (Hodi *et al.*,

2010; Topalian *et al.*, 2012b). Шестнадцать пациентов характеризовались $\geq 80\%$ уменьшением опухоли через 12 недель, включая в себя 5 CR (таблица 10, фиг. 14A и 15-17). В дополнение к 21 пациенту с OR с помощью критериев mWHO, у 4 пациентов наблюдался объективный ответ с помощью связанных с иммунной системой критериев ответа и у 2 пациентов наблюдались неподтвержденные ответы. Эти пациенты не были включены в расчет ORR. Для одновременной схемы лечения общее доказательство клинической активности (обычный, неподтвержденный или связанный с иммунной системой ответ или SD ≥ 24 недель) наблюдалось в 65% (95% CI: 51-78, таблица 10) пациентов. Глубокое влияние одновременной комбинации может быть лучше всего оценено в каскадной диаграмме (фиг. 14B). Ответы продолжались среди 19 из 21 отвечающих на лечение с длительностью в диапазоне от 6,1+ до 72,1+ недель во время анализа данных (таблица 12). Для пациентов в MTD (когорта 2, 1 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб), OR происходила у 9 из 17 (53%; 95% CI: 28-77) пациентов, включая в себя 3 CR. Все 9 отвечающих на лечение достигали $\geq 80\%$ уменьшения опухоли во время первой запланированной во время лечения оценки (таблица 10 и фиг. 14A).

Для пациентов в когортах последовательной схемы лечения, 6 из 30 пациентов достигли OR (20%; 95% CI: 8-39), включая в себя 1 CR. Четыре (13%) пациента достигли 80% уменьшения опухоли в 8 недель (таблица 11 и фиг. 18). Дополнительные пациенты характеризовались наличием связанных с иммунной системой (n=3) или неподтвержденными (n=3) ответов. Когда рассматриваются объективные, связанные с иммунной системой или неподтвержденные ответы или SD ≥ 24 недель, свидетельство о клинической активности для последовательной схемы лечения наблюдалось у 43% (95% CI: 26-63). Каскадная диаграмма показывает, что пациенты, которые не реагировали на предварительный ипилимумаб, могут реагировать на последующий ниволумаб (фиг. 18C).

Таблица 10. Клиническая активность пациентов, получавших одновременную схему лечения с ниволумабом и ипилимумабом*

Кого рта	Доза	Пациенты с поддающимся оценке ответом [†] n	CR n	PR n	uPR [‡] n	irPR [§] n	SD ≥24 нед n	irSD [§] ≥24 нед n	Частота объектив- ного ответа [¶] % [95% CI]	Частота совокупной клинич. акт-ти % [95% CI]	80% редукция опухоли в 12 нед. n (%)
1	0,3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб	14	1	2	0	2	2 (14)	0	21 [5-51]	50 [23-77]	4 (29)
2	1 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб	17	3	6	0	0	0	2 (12)	53 [28-77]	65 [38-86]	7 (41)**
2а	3 мг/кг ниволумаб + 1 мг/кг ипилимумаб	15	1	5	2	1	2 (13)	0	40 [16-68]	73 [45-92]	5 (33)
3	3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб	6	0	3	0	1	0	1 (17)	50 [12-88]	83 [36-100]	0
Все	Обычное лечение	52	5	16	2	4	4 (8)	3 (6)	40 [27-55]	65 [51-78]	16 (31)

* CR обозначает полный ответ, PR частичный ответ, uPR неподтвержденный частичный ответ, irPR связанный с иммунной системой частичный ответ, SD стабильное заболевание, irSD связанное с иммунной системой стабильное заболевание.

† Пациенты с поддающимся оценке ответом представляют собой тех, которые получали хотя бы одну дозу исследуемого терапии, характеризовались измеримым исходным заболеванием и одним из следующих: 1) по меньшей мере одной оценкой опухоли в исследовании, 2) клиническим прогрессированием или 3) смертью до первой оценки опухоли во время лечения.

‡ пациенты, которые характеризовались PR после одной оценки опухоли, но не обладали достаточным последующим временем для подтверждения первоначального PR.

§ Пациенты, которые характеризовались уменьшением опухолевого поражения-мишени в присутствии новых поражений, в соответствии со связанными с иммунной системой PR или SD.

¶ $[(CR + PR)/\text{кол-во пациентов с поддающимся оценке ответом}] \times 100$. Доверительные интервалы рассчитывали по способу Клоппера-Пирсона.

|| $[(CR + PR + uCR + uPR + irPR + SD \geq 24 \text{ недель} + irSD \geq 24 \text{ недель})/\text{кол-во пациентов с поддающимся оценке ответом}] \times 100$.

** Два дополнительных пациента в когорте 2 достигали $\geq 80\%$ уменьшения опухоли во время их первой запланированной оценки, которая была проведена после 12-й недели.

Таблица 11. Клиническая активность пациентов, получавших последовательные схемы лечения ниволумаба и ипилимумаба*

Когор- та	Доза	Пациенты с поддающи мся оценке ответом [†] n	CR n	PR n	uPR [‡] n	irPR [§] n	SD ≥ 24 нед. n	irSD [§] ≥ 24 нед. n	Частота объективно го ответа [¶] % [95% CI]	Частота совокупной клинической активности % [95% CI]	80% уменьшение опухоли в 8 недель n (%)
6	1 мг/кг ниволумаб + предш. ипилимумаб	16	1	5	2	2	1 (6)	0	38 [15-65]	69 [41-89]	4 (25)
7	3 мг/кг ниволумаб + предш. ипилимумаб	14	0	0	1	1	0	0	0	14 [2-43]	0

Когор- та	Доза	Пациенты с поддающи мся оценке ответом [†] n	CR n	PR n	uPR [‡] n	irPR [§] n	SD ≥ 24 нед. n	irSD [§] ≥ 24 нед. n	Частота объективно го ответа [†] % [95% CI]	Частота совокупной клинической активности % [95% CI]	80% уменьшение опухоли в 8 недель n (%)
Все	Последовательное лечение	30	1	5	3	3	1 (3)	0	20 [8-39]	43 [26-63]	4 (13)

* CR обозначает полный ответ, PR частичный ответ, uPR неподтвержденный частичный ответ, irPR связанный с иммунной системой частичный ответ, SD стабильное заболевание, irSD связанное с иммунной системой стабильное заболевание.

† Пациенты с поддающимся оценке ответом представляют собой тех, которые получали хотя бы одну дозу исследуемого терапии, характеризовались измеримым исходным заболеванием и одним из следующих: 1) по меньшей мере одной оценкой опухоли в исследовании, 2) клиническим прогрессированием или 3) смертью до первой оценки опухоли во время лечения.

‡ пациенты, которые характеризовались PR после одной оценки опухоли, но не обладали достаточным последующим временем для подтверждения первоначального PR.

Таблица 12. Продолжительность подтвержденных объективных ответов отдельных пациентов

Когорта	Доза	Ответ	Продолжительность ответа, недели
1	0,3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб	CR	48,0+

Когорта	Доза	Ответ	Продолжительность ответа, недели
		PR	72,1+, 65,4+
2	1 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб	CR	36,1+, 28,9+, 24,7+
		PR	54,4+, 52,6, 23+, 18,4+, 14,0 +, 11,1+
2a	3 мг/кг ниволумаб + 1 мг/кг ипилимумаб	CR	7,7+
		PR	18,1+, 12,3, 6,6+, 6,4+, 6,1+
3	3 мг/кг ниволумаб + 3 мг/кг ипилимумаб	PR	38,7+, 31,3+, 12,1+
6	1 мг/кг ниволумаб + ргiог ипилимумаб	CR	24,1+
		PR	16,1+, 12,1+, 8,7+, 8,4+, 8,1+
7	3 мг/кг ниволумаб + ргiог ипилимумаб	CR	NA*
		PR	NA*

* Отсутствует; по состоянию на дату настоящего анализа не зарегистрировано подтвержденных объективных ответов.

Оценка экспрессии опухолевых PD-L1 и абсолютного количества лимфоцитов

Экспрессию опухолевых PD-L1 и изменения ALC в периферической крови изучали в качестве биомаркеров для монотерапии с ниволумабом и ипилимумабом, соответственно (Topalian *et al.*, 2012b; Berman *et al.*, 2009; Ku *et al.*, 2010; Postow *et al.*, 2012; Delyon *et al.*, 2013). Экспрессию опухолевых PD-L1 характеризовали с помощью ИНС окрашивания, и анализировали фармакодинамические изменения ALC в периферической крови. Использование $\geq 5\%$ граничного значения для определения положительности PD-L1, опухолевые образцы 21 из 56 (38%) пациентов были PD-L1-положительными. OR были замечены у пациентов либо с PD-L1-положительными (6/13), либо с PD-L1-отрицательными (9/22) опухолями среди пациентов, получавших одновременную схему лечения (апостериорное Р-значение $> 0,99$; точный критерий Фишера). В когортах последовательной схемы лечения, численно большее количество общих ответов было замечено у пациентов с PD-L1-положительными образцами опухолей (4/8), по сравнению с пациентами с PD-L1-отрицательными опухолями (1/13), но цифры небольшие.

В отличие от наблюдений с монотерапией с ипилимумабом, соответствующий рост ALC от базового не был обнаружен у пациентов, получавших одновременную комбинацию или у пациентов, получавших ниволумаб после терапии с ипилимумабом. В когорте одновременной схемы лечения пациентов с низким ALC на неделях от 5 до 7 (<1000 клеток/мкл) (Ku *et al.*, 2010) характеризовались подобными OR (43%), по сравнению с пациентами с нормальной ALC на неделе от 5 до 7 (40%). Кроме того, в когорте последовательной схемы лечения 17% пациентов с низкой ALC характеризовались OR и 23% пациентов с нормальным или высоким ALC характеризовались наличием OR.

Обзор перечня последовательностей

SEQ ID NO:	Описание
1	Аминокислотная последовательность V _H в 17D8
2	Аминокислотная последовательность V _H в 2D3
3	Аминокислотная последовательность V _H в 4H1
4	Аминокислотная последовательность V _H в 5C4
5	Аминокислотная последовательность V _H в 4A11
6	Аминокислотная последовательность V _H в 7D3
7	Аминокислотная последовательность V _H в 5F4

SEQ ID NO:	Описание
8	Аминокислотная последовательность V _L в 17D8
9	Аминокислотная последовательность V _L в 2D3
10	Аминокислотная последовательность V _L в 4H1
11	Аминокислотная последовательность V _L в 5C4
12	Аминокислотная последовательность V _L в 4A11
13	Аминокислотная последовательность V _L в 7D3
14	Аминокислотная последовательность V _L в 5F4
15	Аминокислотная последовательность V _H в 3G10
16	Аминокислотная последовательность V _H в 12A4
17	Аминокислотная последовательность V _H в 10A5
18	Аминокислотная последовательность V _H в 5F8
19	Аминокислотная последовательность V _H в 10H10
20	Аминокислотная последовательность V _H в 1B12
21	Аминокислотная последовательность V _H в 7H1
22	Аминокислотная последовательность V _H в 11E6
23	Аминокислотная последовательность V _H в 12B7
24	Аминокислотная последовательность V _H в 13G4
25	Аминокислотная последовательность V _L в 3G10
26	Аминокислотная последовательность V _L в 12A4
27	Аминокислотная последовательность V _L в 10A5
28	Аминокислотная последовательность V _L в 5F8
29	Аминокислотная последовательность V _L в 10H10
30	Аминокислотная последовательность V _L в 1B12
31	Аминокислотная последовательность V _L в 7H1
32	Аминокислотная последовательность V _L в 11E6
33	Аминокислотная последовательность V _L в 12B7
34	Аминокислотная последовательность V _L в 13G4
35	Аминокислотная последовательность V _H в 28-8
36	Аминокислотная последовательность V _L в 28-8
37	Последовательность CDR1 тяжелой цепи в 28-8
38	Последовательность CDR2 тяжелой цепи в 28-8
39	Последовательность CDR3 тяжелой цепи в 28-8
40	Последовательность CDR1 легкой цепи в 28-8

SEQ ID NO:	Описание
41	Последовательность CDR2 легкой цепи в 28-8
42	Последовательность CDR1 легкой цепи в 28-8

ССЫЛКИ

- Amin A *et al.* (2013) A phase 1 study of nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558) in combination with sunitinib, pazopanib or ipilimumab in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). Abstract at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago (в печати).
- Baitsch *et al.* (2012) *PloS One* 7(2):e30852.
- Barbas *et al.* (1994) *J Am Chem Soc* 116:2161-62.
- Barbas *et al.* (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2529-33.
- Beck *et al.* (2006) *J Clin Oncol* 24:2283-89.
- Beiboer *et al.* (2000) *J Mol Biol* 296:833-49.
- Berezov *et al.* (2001) *BLAjournal* 8:Scientific Review 8.
- Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol Immunother* 54:307-14.
- Bordeaux *et al.* (2010) *BioTechniques* 48:197-209.
- Bourgeois *et al.* (1998) *J Virol* 72:807-10.
- Brahmer *et al.* (2010) *J Clin Oncol* 28:3167-75.
- Brahmer *et al.* (2012) *N Engl J Med* 366:2455-65.
- Butte *et al.* (2007) *Immunity* 27:111-22.
- Butte *et al.* (2008) *Mol Immunol* 45:3567-72.
- Chapman *et al.* (2011) *N Engl J Med* 364:2507-16.
- Cheang *et al.* (2006) *J Clin Oncol* 24:**5637-44**.
- Chow LQ *et al.* (2013) Phase 1 dose escalation study of recombinant interleukin-21 (rIL-21; BMS-982470) in combination with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538) in patients (pts) with advanced or metastatic solid tumors. Abstract at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago (в печати).
- Condeelis and Weissleder (2010) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003848.
- Clinical Trials Website, <http://www.clinicaltrials.gov>, дата последнего обращения 13 мая 2013 г.
- Coppin *et al.* (2005) *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD001425.
- Dasanu *et al.* (2012) *Expert Opin Biol Ther* 12:923-37.
- Ditzel *et al.* (1996) *J Immunol* 157:739-49.
- Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:793-800.

- Dong *et al.* (2003) *J Mol Med* 81:281-87.
- Dong *et al.* (2004) *Immunity* 20:327-36.
- Epitomics (2013) <http://www.epitomics.com/services/7point.php#>, дата последнего обращения 13 мая 2013 г.
- Eton *et al.* (2002) *J Clin Oncol* 20:2045-52.
- Facciabene *et al.* (2012) *Cancer Res* 72:2162-71.
- Fife *et al.* (2009) *Nat Immunol* 10:1185-92.
- Fischer *et al.* (2008) *PloS One* 3(12):e4069.
- Flies *et al.* (2011) *Yale J Biol Med* 84:409-21.
- Gadiot *et al.* (2011) *Cancer* 117:2192-201.
- Garbe *et al.* (2012) *Eur J Cancer* 48:2375-90.
- Girard *et al.* (2009) *J Thorac Oncol* 4:1544-49.
- Gridelli *et al.* (2008) *J Thorac Oncol* 3:430-40.
- Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34.
- Gajewski *et al.* (2010) *Cancer J* 16:399-403.
- Hamanishi *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3360-65.
- Hamid and Carvajal (2013) *Expert Opin Biol Ther*, Feb 19. [Предпечатная электронная публикация]
- Hanna *et al.* (2004) *J Clin Oncol* 22:1589-97.
- He *et al.* (2004) *J Immunol* 173:4919-28.
- Hino *et al.* (2010) *Cancer* 116:1757-66.
- Hodi *et al.* (2010) *N Engl J Med* 363:711-23.
- Hodi FS *et al.* (2013) An open-label, randomized, phase 2 study of nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558) given sequentially with ipilimumab in patients (pts) with advanced or metastatic melanoma (MEL). Abstract at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago (в печати).
- Hollinger and Hudson (2005) *Nature Biotech* 23(9):1126-36.
- Holt and Disis (2008) *Clin Lung Cancer* 9 Suppl 1:S13-19.
- Holt *et al.* (2011) *Therapy* 8:43-54.
- Hudes *et al.* (2007) *N Engl J Med* 356(22):2271-81.
- Hutson *et al.* (2012) *Ann Oncol* 23 (Suppl. 9): ix14, Abstr LBA22 PR.
- Igarashi *et al.* (1995) *J Biochem (Tokyo)* 117:452-7.
- Iwai *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12293-97.
- Kim and Ahmed (2010) *Curr Opin Immunol* 22:223-30.
- Klimka *et al.* (2000) *Br J Cancer* 83(2):252-60.

- Konishi *et al.* (2004) *Clin Cancer Res* 10:5094-100.
- Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8.
- Lebbe *et al.* (2012) *Ann Oncol* 23 (Suppl 9):ix363, Abstr 116PD.
- Levi *et al.* (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4374-78.
- Lipson *et al.* (2013) *Clin Cancer Res* 19:462-68.
- Marincola *et al.* (2012) *Adv Immunol* 74:181-273.
- McCabe and Wu (2010) *Cancer Biother Radiopharm* 25(3):253-61.
- McDermott and Atkins (2006) *Semin Oncol* 33:583-87.
- Mellman *et al.* (2011) *Nature* 480:480-489.
- Miller (2006) *Semin Oncol* 33:S25-S31.
- Mizoguchi *et al.* (1992) *Science* 258:1795-98.
- Motzer *et al.* (2008) *Lancet* 372:449-56.
- Motzer *et al.* (2010) *Cancer* 116:4256-65.
- Mulders (2009) *BJU Int* 104:1585-89.
- NCCN GUIDELINES® (2013), доступно по адресу:
http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site, дата последнего обращения 13 мая 2013 г.
- Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141-51.
- Olafsen and Wu (2010) *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.
- Pardoll (2012) *Nat Rev Cancer* 12:252-64.
- Park *et al.* (2010) *Blood* 116:1291-98.
- Parry *et al.* (2005) *Mol Cell Biol* 25:9543-53.
- Paterson *et al.* (2011) *J Immunol* 187:1097-105.
- Публикация РСТ-заявки № WO 00/37504, опубликовано 29 июня 2000 года Pfizer, Inc. и Abgenix, Inc.
- Публикация РСТ-заявки № WO 01/14424, опубликовано 1 марта 2001 года Medarex, Inc.
- РСТ-Публикация № WO 2011/066389, опубликовано 3 июня 2011 года MedImmune Ltd.
- РСТ-Публикация № WO 2012/145493, опубликовано 26 октября 2012 года Amplimmune, Inc.
- Phan *et al.* (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8372-77.
- Polymenis and Stoller (1994) *J Immunol* 152:5218-29.
- Rader *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8910-15.
- Ribas *et al.* (2005) *J Clin Oncol* 23:8968-77.

Rizvi NA *et al.* (2013) A phase 1 study of nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) + platinum-based doublet chemotherapy (PT-doublet) in chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). Abstract at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago (в печати).

Robert *et al.* (2011) *N Engl J Med* 364:2517-26.

Rossi *et al.* (2005) *Am J Clin Pathol* 124:295-302.

Sanborn R *et al.* (2013) A phase 1 dose escalation and cohort expansion study of lirilumab (anti-KIR; BMS-986015) administered in combination with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558) in advanced refractory solid tumors. Abstract at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago (в печати).

Scagliotti *et al.* (2011) *J Thorac Oncol* 6:64-70.

Scartozi *et al.* (2010) *Lung Cancer* 68:433-37.

Sreiber *et al.* (2011) *Science* 331:1565-70.

Sharma *et al.* (2011) *Nat Rev Cancer* 11:805-12.

Shepherd *et al.* (2000) *J Clin Oncol* 18:2095-103.

Shepherd *et al.* (2011) *J Thoracic Oncol* 6:1763-73.

Shepherd *et al.* (2005) *N Engl J Med* 353:123-32.

Siegel *et al.* (2013) *CA Cancer J Clin* 63:11-30.

Sjoblom *et al.* (2006) *Science* 314:268-74.

Sosman *et al.* (2012) *N Engl J Med* 366:707-14.

Sompuram *et al.* (2006) *Am J Clin Pathol* 125:82-90.

Taube *et al.* (2012) *Sci Transl Med* 4:127ra37.

Thompson *et al.* (2006) *Cancer Res* 66:3381-85.

Tivol *et al.* (1995) *Immunity* 3:541-47.

Topalian *et al.* (2011) *J Clin Oncol* 29:4828-36.

Topalian *et al.* (2012a) *Curr Opin Immunol* 24:1-6.

Topalian *et al.* (2012b) *N Engl J Med* 366:2443-54.

Topalian *et al.* (2012c) *Curr Opin Immunol* 24:207-12.

Topalian SL *et al.* (2013) Survival and long-term safety in cancer patients receiving the PD-1 antibody nivolumab, *N Engl J Med* (в печати).

Патент США № 6,051,227, выданный 18 апреля 2000 года Allison *et al.*

Патент США № 6,808,710, выданный 26 октября 2004 года Wood *et al.*

Патент США № 6,984,720, выданный 10 января 2006 года Korman *et al.*

Патент США № 7,034,121, выданный 25 апреля 2006 года Carreno *et al.*

Патент США № 7,488,802, выданный 10 февраля 2009 года Collins *et al.*

Патент США № 7,635,757, выданный 22 декабря 2009 года Freeman *et al.*

Патент США № 7,943,743, выданный 17 мая 2011 года Korman *et al.*

Патент США № 8,008,449, выданный 30 августа 2011 года Korman *et al.*

Патент США № 8,168,757, выданный 1 мая 2012 года Finnefrock *et al.*

Патент США № 8,217,149, выданный 10 июля 2012 года Irving *et al.*

Патентная публикация США № 2009/0317368, опубликовано 24 декабря 2009 года Chen *et al.*

Weber JS *et al.* (2013) Safety and efficacy of nivolumab with vaccine in ipilimumab-naïve or -refractory melanoma (отправлено в журнал).

Wolchok *et al.* (2009) *Clin Cancer Res* 15:7412-20.

Wolchok *et al.* (2010) *Lancet Oncol* 11:155-64.

Wolchok JD *et al.* (2013a) Nivolumab (anti-PD-1) plus ipilimumab (anti-CTLA-4) in advanced melanoma. *N Engl J Med.* (в печати).

Wolchok JD *et al.* (2013b) Clinical activity and safety of nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) in combination with ipilimumab in patients (pts) with advanced melanoma (MEL). Abstract at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago (в печати).

Wolchok JD *et al.* (2013c) Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Ann Oncol* (в печати).

Xu and Davis (2000) *Immunity* 13: 37-45.

Yang *et al.* (2011) *J Immunol* 187:1113-19.

Zou and Chen (2008) *Nat Rev Immunol* 8:467-77.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывается с полипептидом programmed death ligand 1 («PD-L1»), которое содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, и области CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36.

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий участок по п. 1, причем антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательно связанные аминокислоты, характеризующиеся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36.

3. Набор, содержащий: (i) антитело или его антигенсвязывающий участок по п. 1 или 2 и (ii) инструкции по обнаружению экспрессии PD-L1 в образце ткани, полученном от субъекта, с использованием антитела или его антигенсвязывающего участка.

4. Набор, содержащий: (i) антитело или его антигенсвязывающий участок по п. 1 или 2 и (ii) инструкции по анализу мембранной экспрессии PD-L1 в образце ткани, полученном от субъекта, с использованием антитела или его антигенсвязывающего участка.

5. Набор по п. 3 или 4, дополнительно содержащий антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с programmed death 1 человека («PD-1») («антитело к PD-1») или PD-L1 человека («антитело к PD-L1») и инструкции по введению антитела к PD-1 или антитела к PD-L1 субъекту, который идентифицирован как характеризующийся положительной экспрессией PD-L1.

6. Набор по любому из пп. 3-5, причем образец ткани содержит опухолевые клетки.

7. Способ измерения мембранного PD-L1 на выделенных опухолевых клетках, предусматривающий выполнение иммуногистохимического анализа с использованием антитела или его антигенсвязывающего участка по п. 1 или 2.

8. Способ лечения человека, страдающего от злокачественной опухоли, предусматривающий введение субъекту антитела к PD1 или его антигенсвязывающего участка или антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего участка, при этом субъект идентифицируется как подходящий для иммунотерапии с использованием антитела или его антигенсвязывающего участка по п. 1 или 2 для обнаружения экспрессии полипептида PD-L1 в исследуемом образце ткани, полученном от субъекта.

9. Способ по п. 8, при котором субъект, характеризующийся экспрессией PD-L1, идентифицируется как подходящий для иммунотерапии.

10. Способ по п. 8 или 9, при котором экспрессию PD-L1 определяют с помощью иммуногистохимического анализа исследуемого образца ткани.

11. Способ по п. 10, при котором иммуногистохимический анализ представляет собой автоматический иммуногистохимический анализ.

12. Способ по любому из пп. 8-11, при котором злокачественная опухоль представляет собой гематологическое злокачественное образование, выбранное из множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина/первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы, неходжкинских лимфом, острой миелоидной лимфомы, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоидного лейкоза, фолликулярной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, иммунобластной крупноклеточной лимфомы, лимфобластной лимфомы предшественников В-клеток, лимфомы клеток мантии, острого лимфобластного лейкоза, грибовидного микоза, анапластической крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы и лимфобластной лимфомы предшественников Т-клеток.

13. Способ по любому из пп. 8-12, при котором злокачественная опухоль представляет собой прогрессирующую, рецидивирующую, метастатическую и/или не поддающуюся лечению злокачественную опухоль.

14. Способ по любому из пп. 8-13, при котором злокачественная опухоль представляет собой меланому, почечно-клеточную карциному, NSCLC, кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC) или колоректальный рак (CRC).

15. Способ по любому из пп. 8-14, при котором образец исследуемой ткани представляет собой фиксированный в формалине и заключенный в парафин (FFPE) образец ткани.

16. Способ по любому из пп. 8-15, при котором по меньшей мере 1% опухолевых клеток экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности.

17. Способ по любому из пп. 8-16, при котором по меньшей мере 5% опухолевых клеток экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности.

18. Способ идентификации субъекта, подходящего для иммунотерапии, предусматривающий измерение экспрессии PD-L1 в образце исследуемой ткани, полученном от субъекта, с помощью антитела или его антигенсвязывающего участка по п. 1 или 2, причем субъект страдает от злокачественной опухоли.

19. Способ по п. 18, при котором субъект, характеризующийся экспрессией PD-L1, идентифицируется как подходящий для иммунотерапии.

20. Способ по п. 18 или 19, при котором субъекту, который идентифицирован как подходящий для иммунотерапии, должна быть введена композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела к PD-1 или антитела к PD-L1.

21. Способ по любому из пп. 18-20, при котором экспрессию PD-L1 определяют с помощью иммуногистохимического анализа исследуемого образца ткани.

22. Способ по п. 21, при котором иммуногистохимический анализ представляет собой автоматический иммуногистохимический анализ.

23. Способ по любому из пп. 18-22, при котором злокачественная опухоль представляет собой гематологическое злокачественное образование, выбранное из множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина/первичной

медиастинальной В-клеточной лимфомы, неходжкинских лимфом, острой миелоидной лимфомы, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоидного лейкоза, фолликулярной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, иммунобластной крупноклеточной лимфомы, лимфобластной лимфомы предшественников В-клеток, лимфомы клеток мантии, острого лимфобластного лейкоза, грибовидного микоза, анапластической крупноклеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы и лимфобластной лимфомы предшественников Т-клеток.

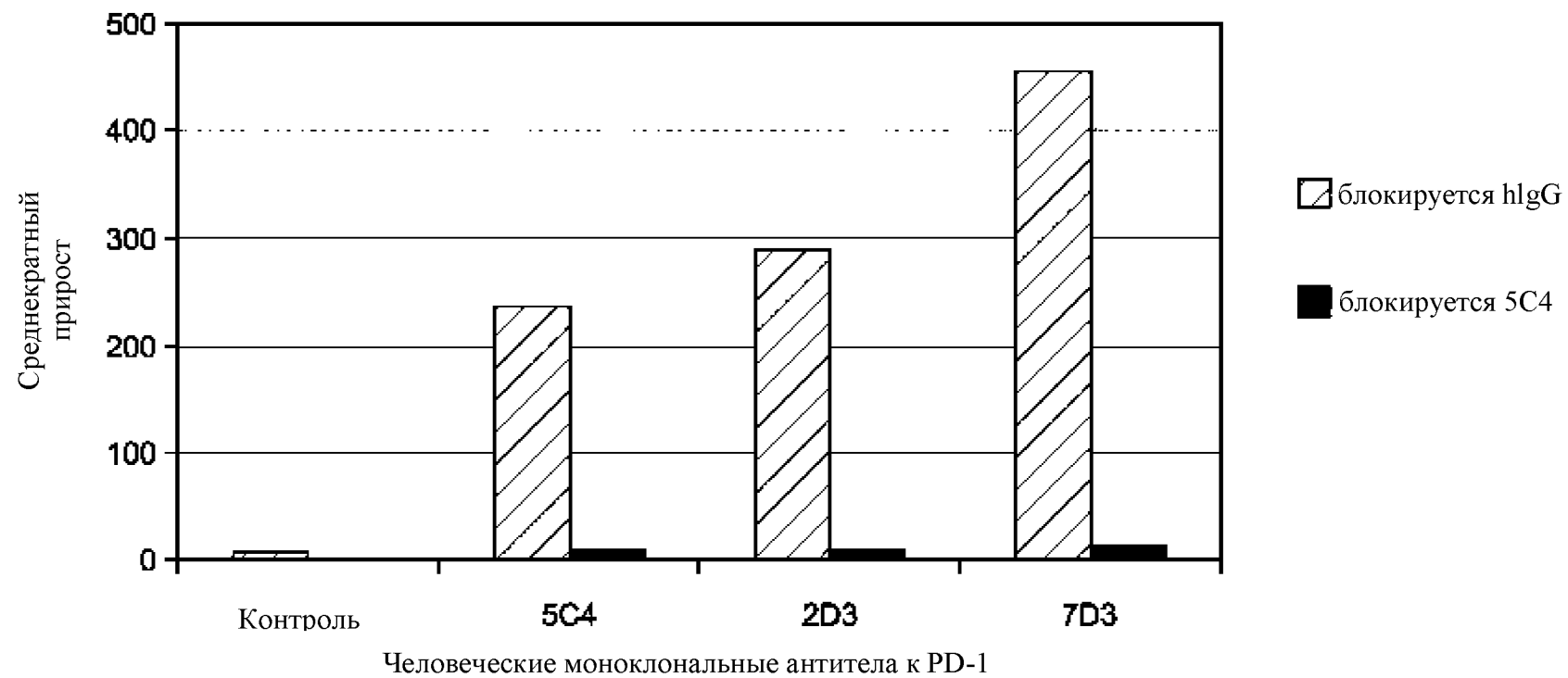
24. Способ по любому из пп. 18-23, при котором злокачественная опухоль представляет собой прогрессирующую, рецидивирующую, метастатическую и/или не поддающуюся лечению злокачественную опухоль.

25. Способ по любому из пп. 18-24, при котором злокачественная опухоль представляет собой меланому, почечно-клеточную карциному, NSCLC, кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC) или колоректальный рак (CRC).

26. Способ по любому из пп. 18-25, при котором образец исследуемой ткани представляет собой фиксированный в формалине и заключенный в парафин (FFPE) образец ткани.

27. Способ по любому из пп. 18-26, при котором по меньшей мере 1% опухолевых клеток экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности.

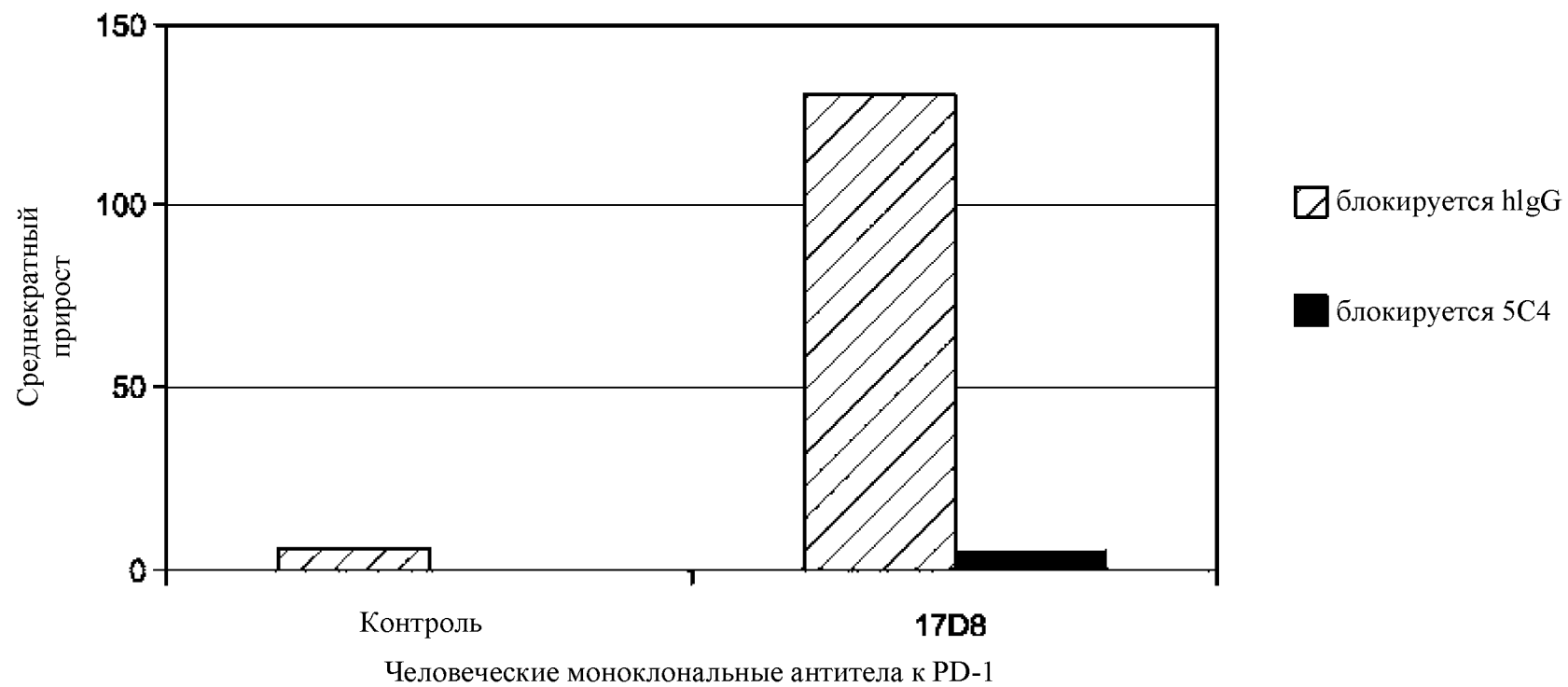
28. Способ по любому из пп. 18-27, при котором по меньшей мере 5% опухолевых клеток экспрессируют PD-L1 на клеточной поверхности.



Фиг. 1А

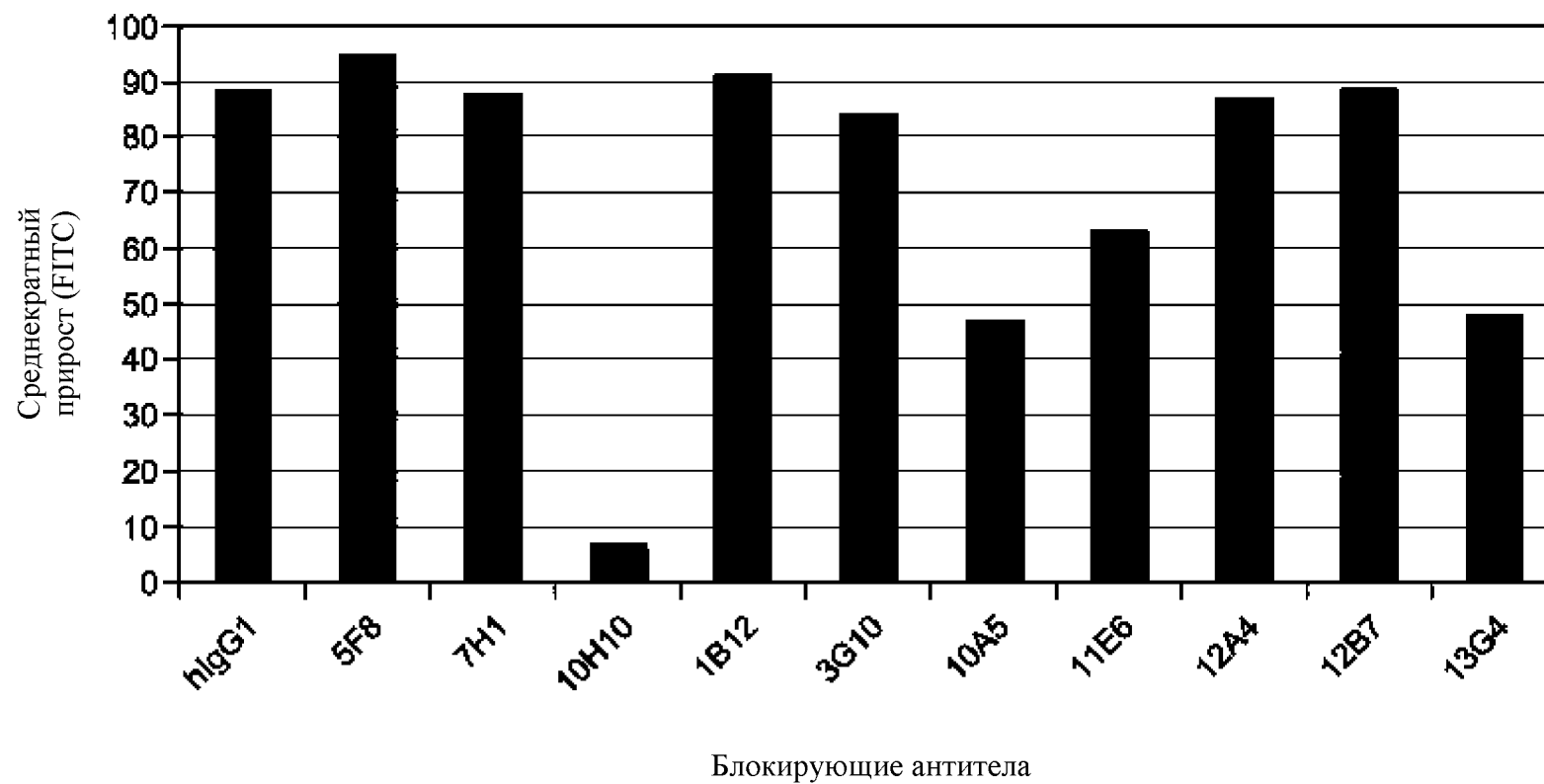


Фиг. 1В



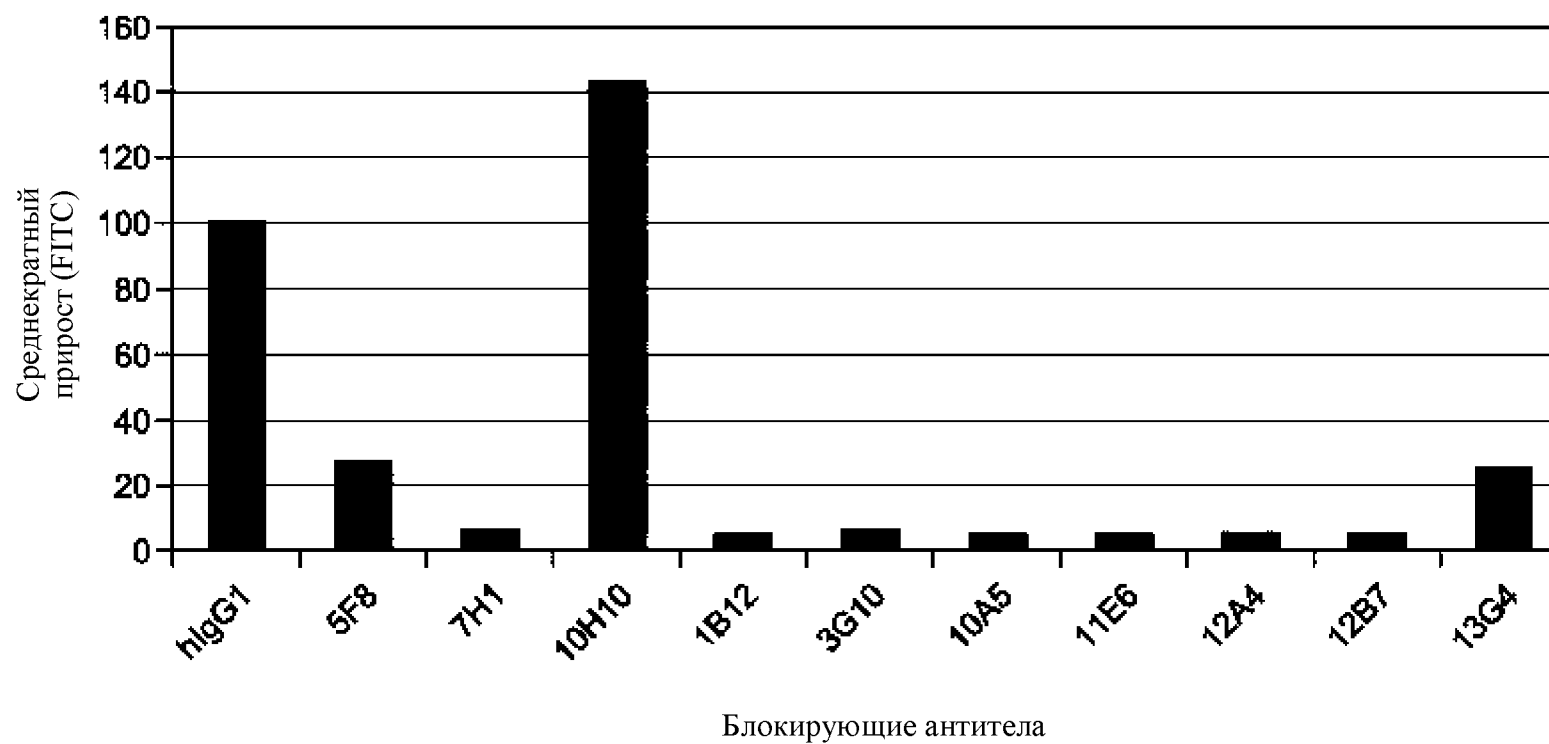
Фиг. 1С

Связывание FITC-10H10 с блокированными человеческим
антителом к hPD-L1 клетками CHO/PD-L1



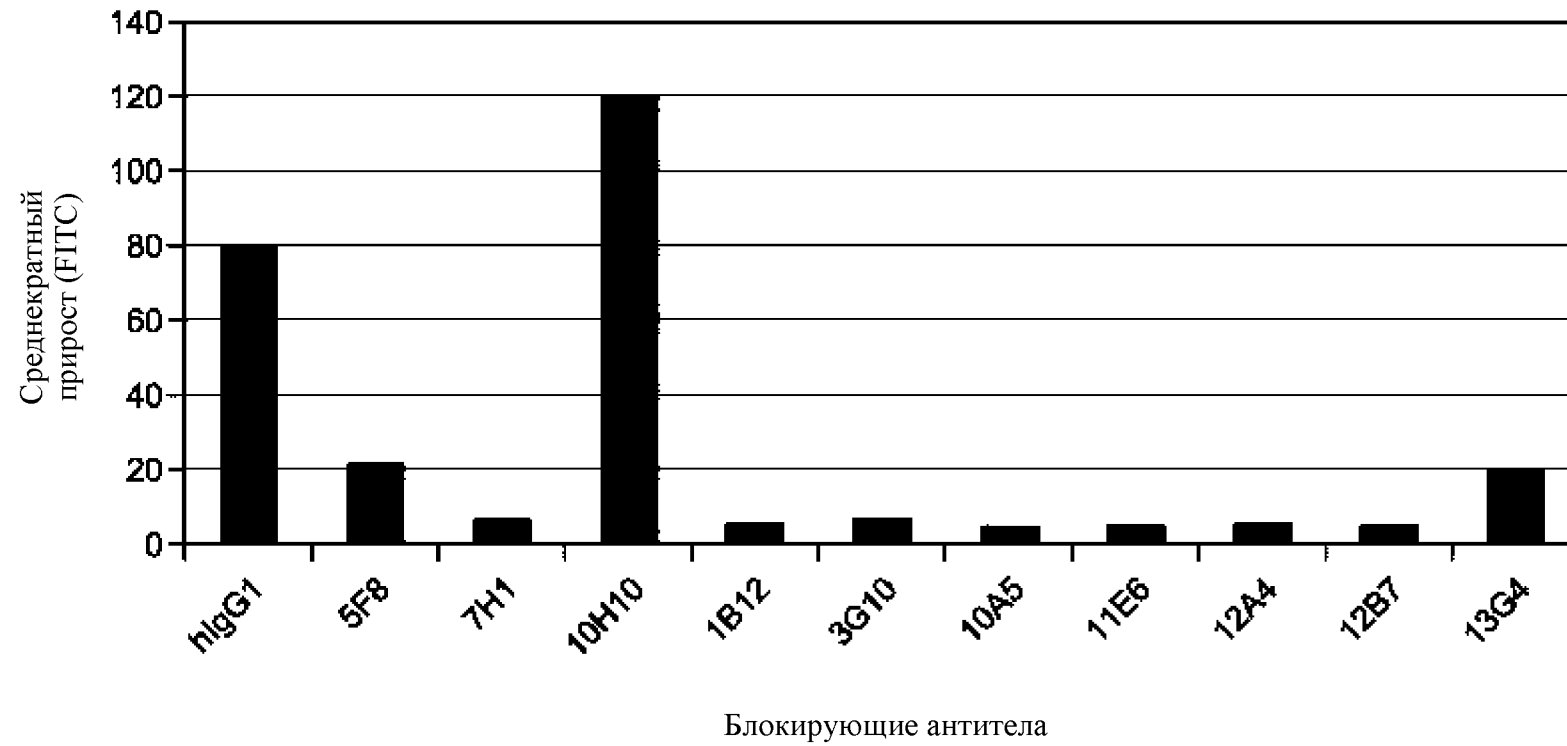
Фиг. 2А

Связывание FITC-3G10 с блокированными человеческим
антителом к hPD-L1 клетками CHO/PD-L1



Фиг. 2В

Связывание FITC-10A5 с блокированными человеческим
антителом к hPD-L1 клетками CHO/PD-L1



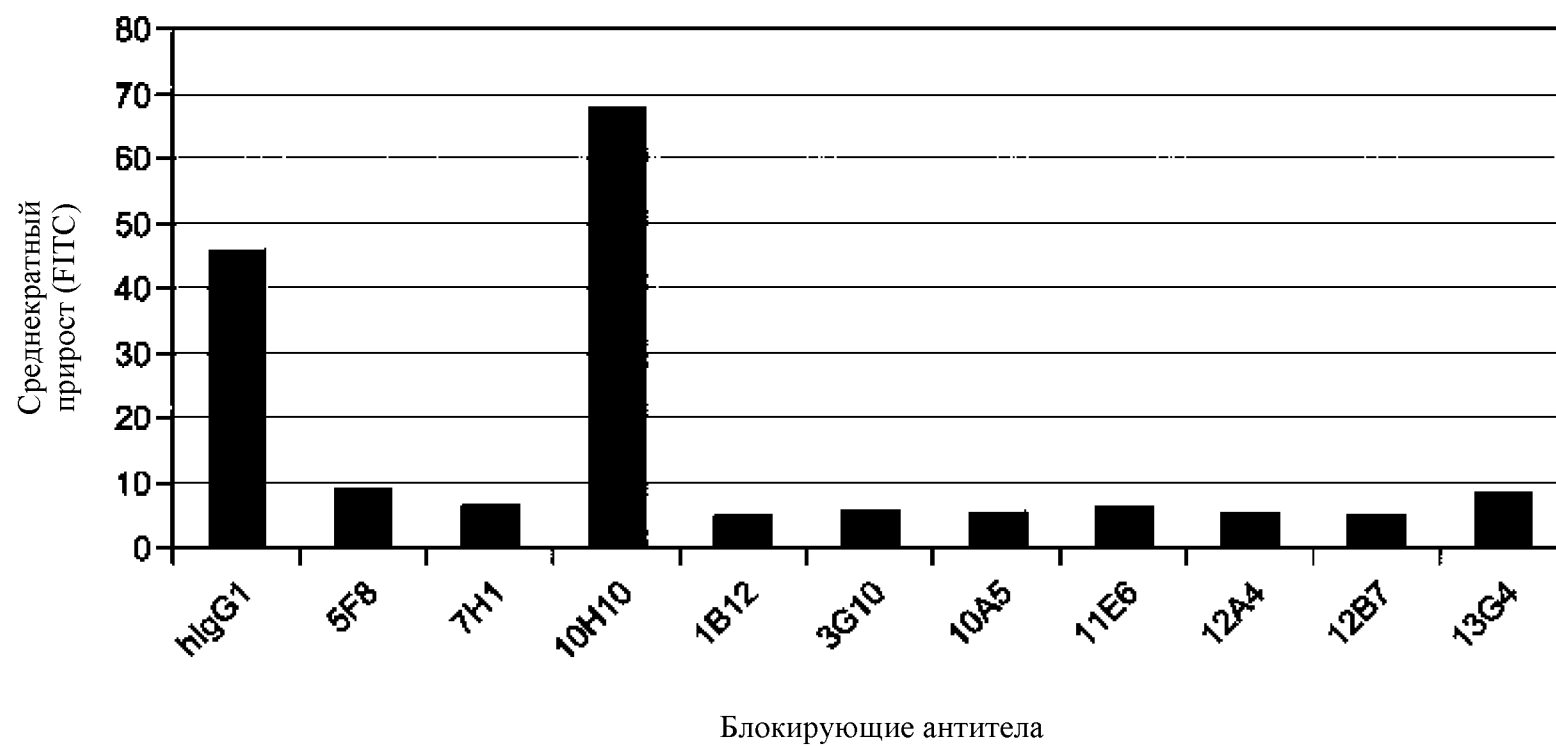
Фиг. 2С

Связывание FITC-11E6 с блокированными человеческим
антителом к hPD-L1 клетками CHO/PD-L1



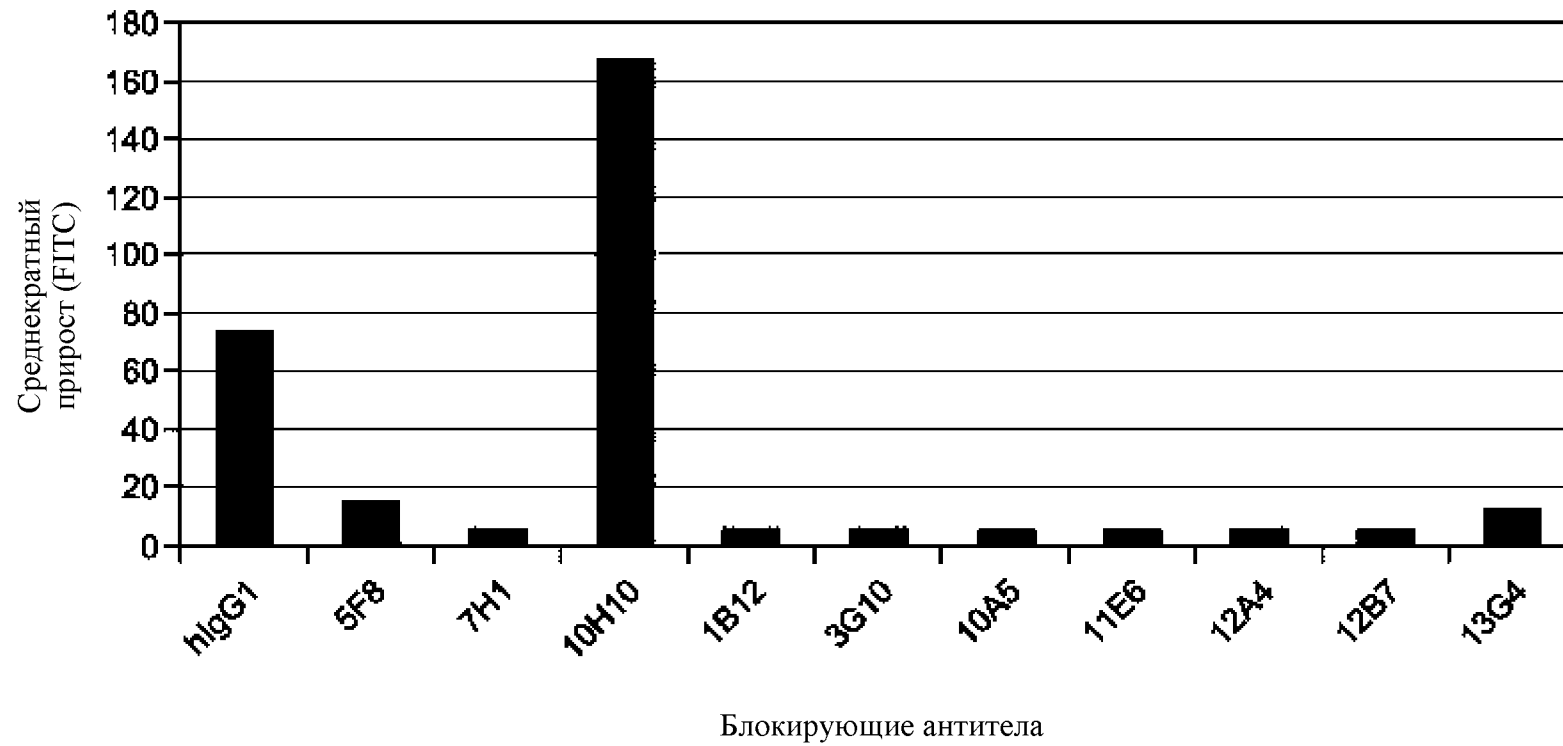
Фиг. 2D

Связывание FITC-12A4 с блокированными человеческим
антителом к hPD-L1 клетками CHO/PD-L1



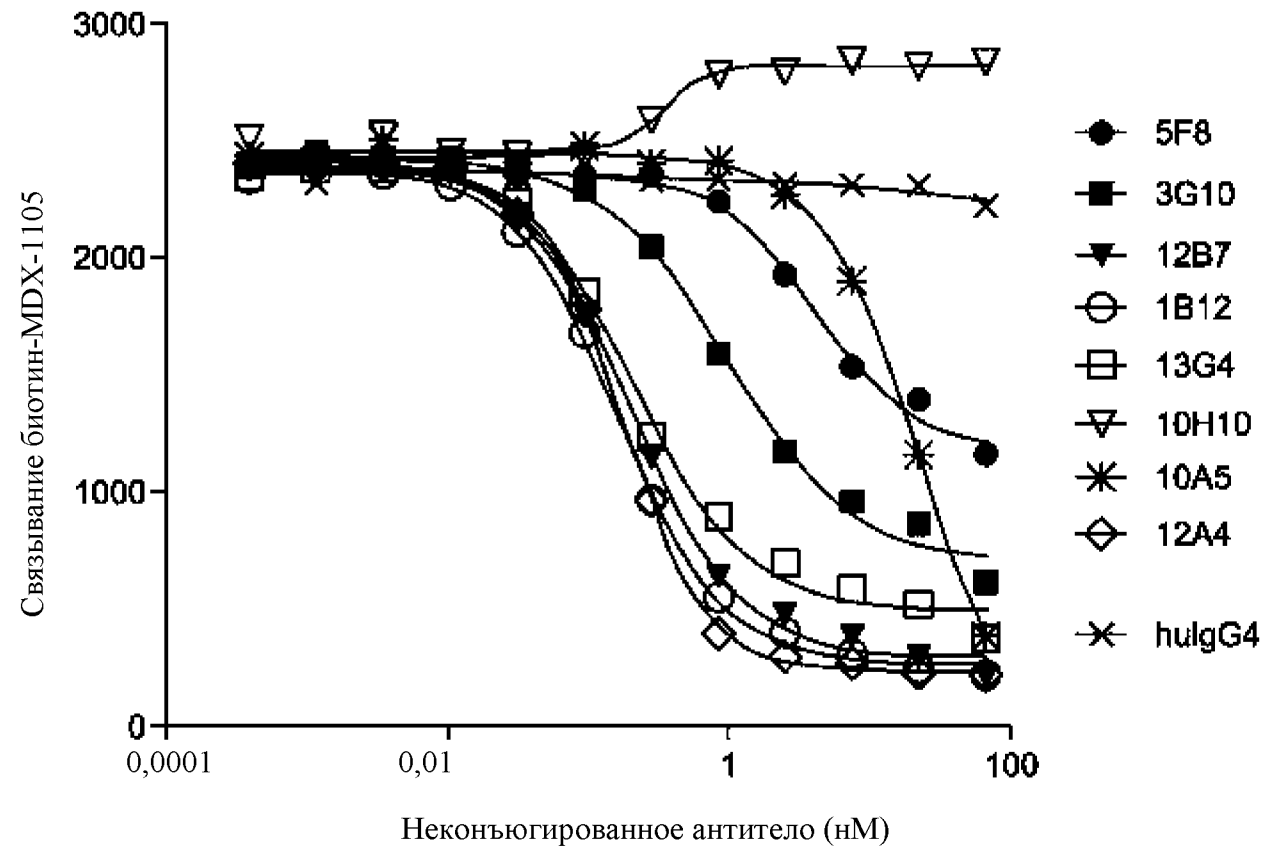
Фиг. 2Е

Связывание FITC-13G4 с блокированными человеческим
антителом к hPD-L1 клетками CHO/PD-L1

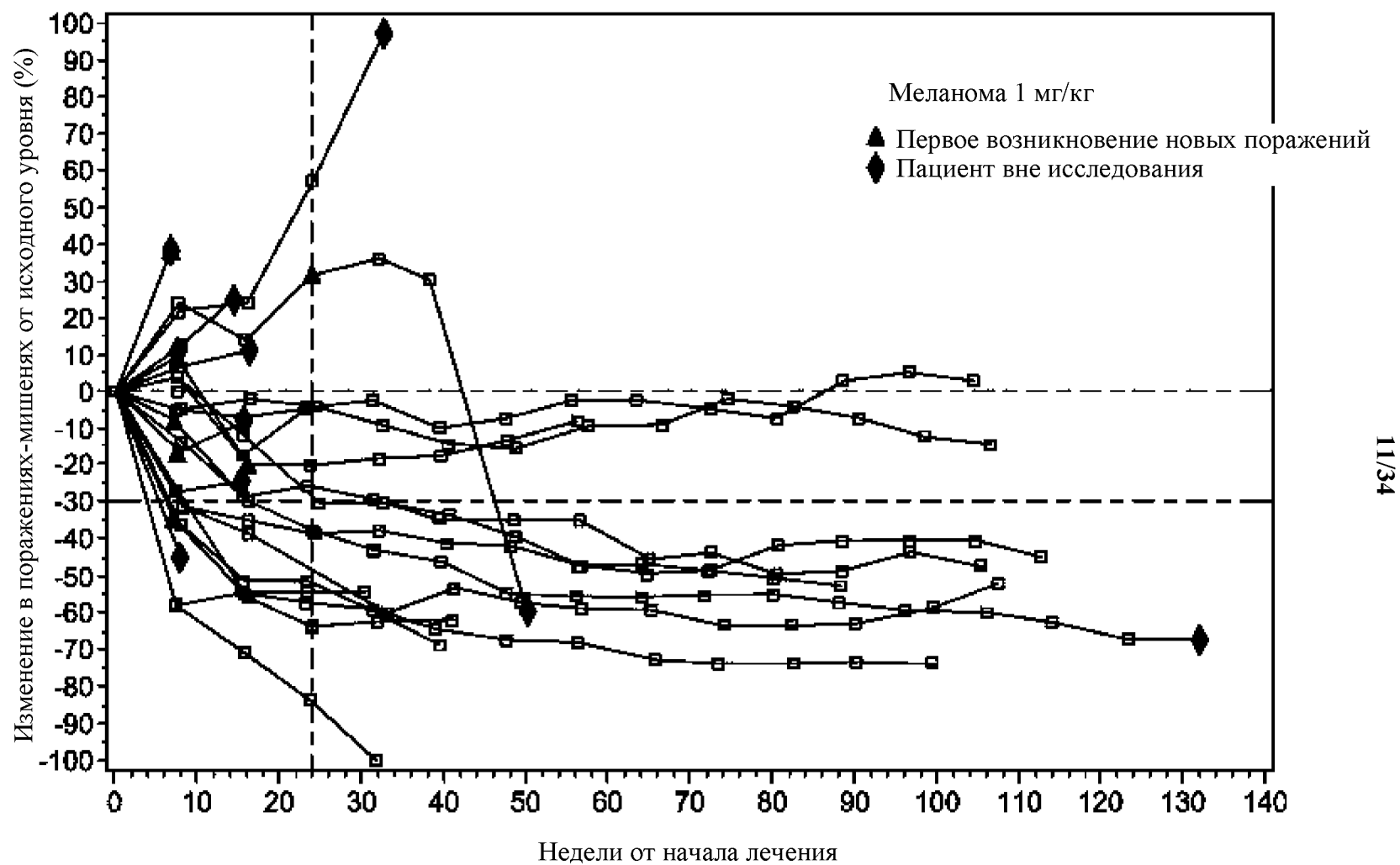


Фиг. 2F

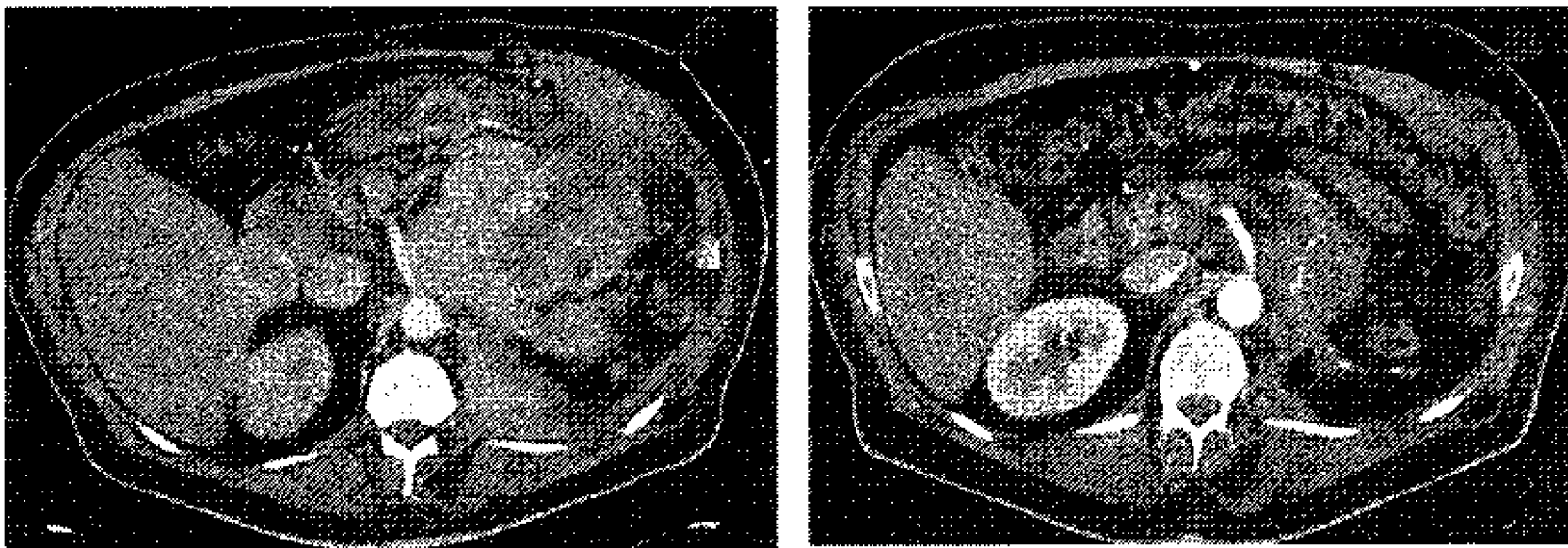
Блокада человеческими моноклональными антителами hPD-L1
связывания биотин-12A4 с клетками ES-2



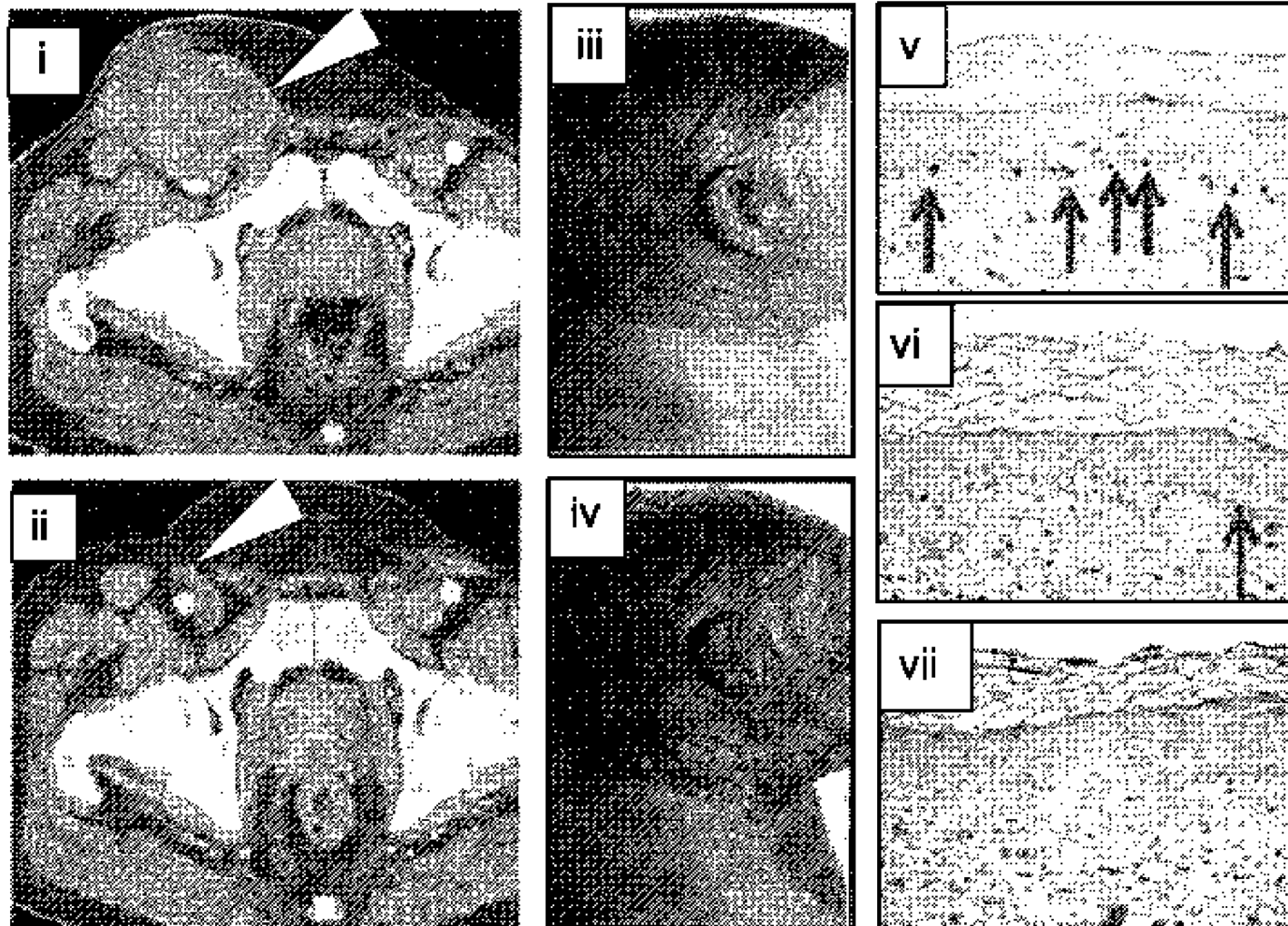
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

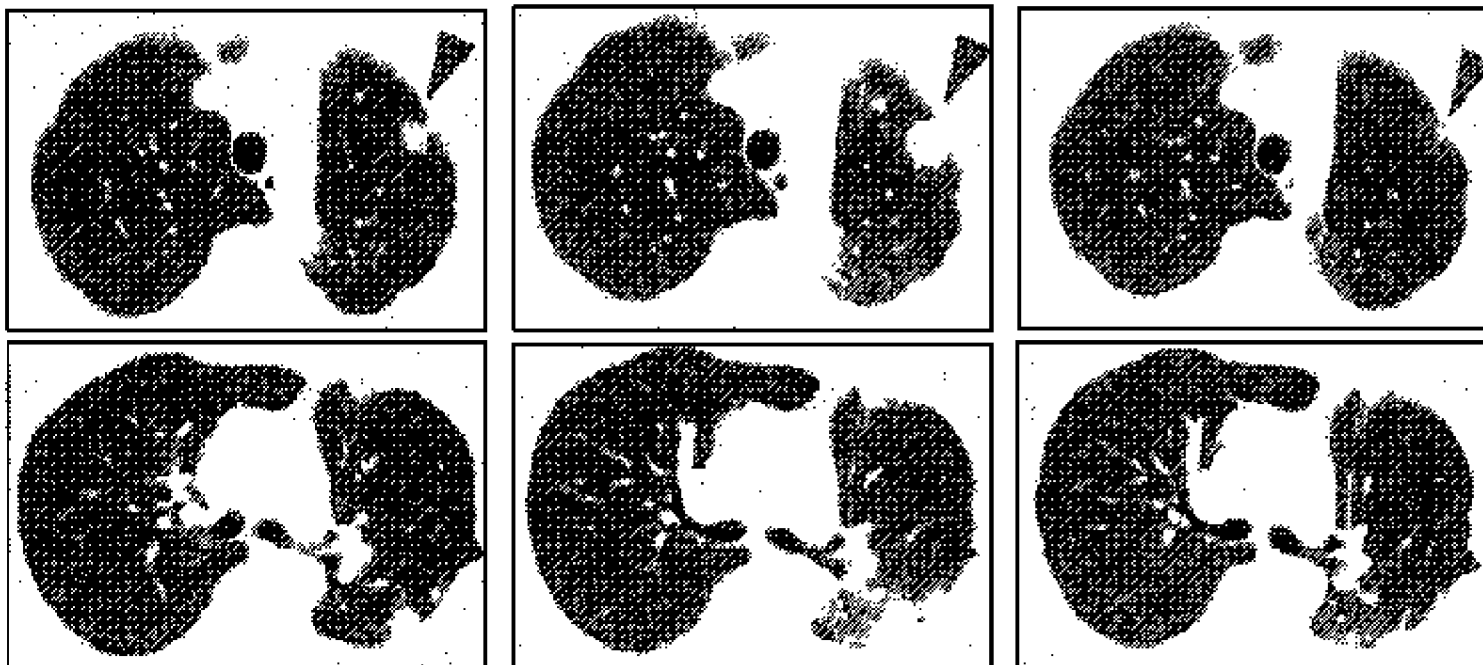


Фиг. 6

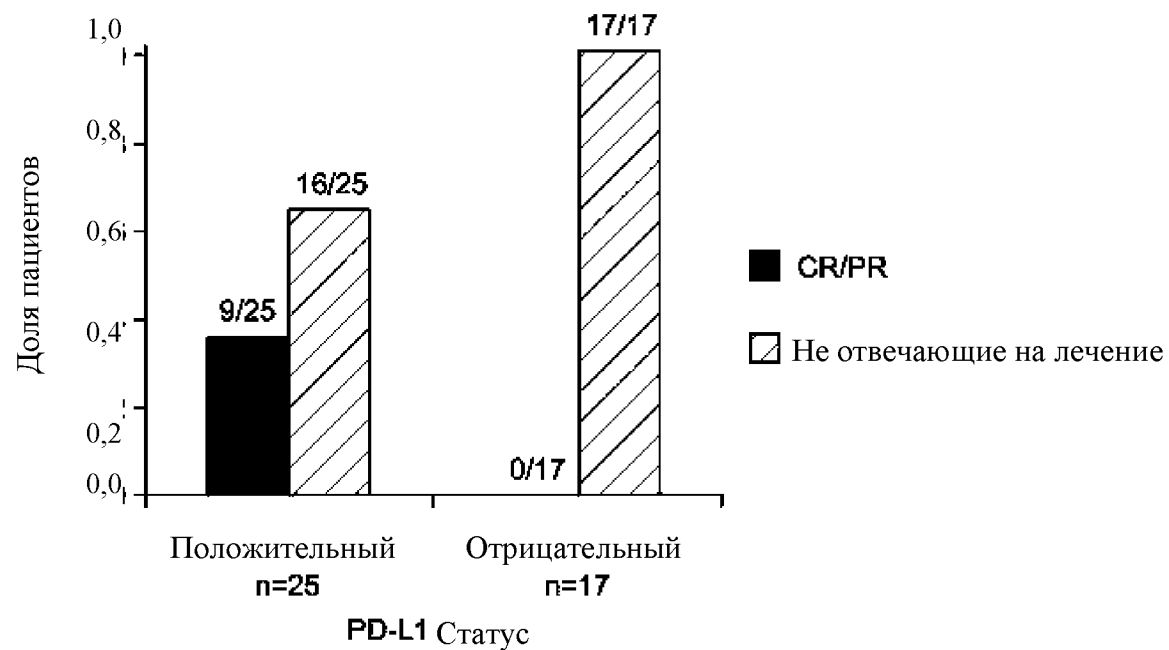
Предшествующее лечения

2 месяца

4 месяца



Фиг. 7

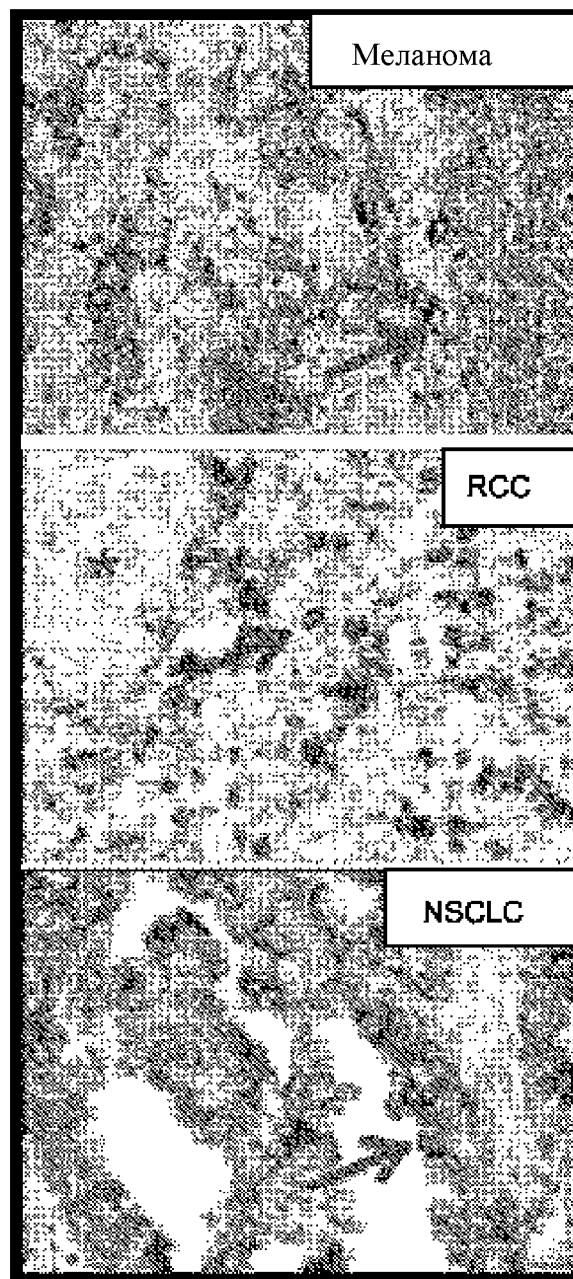


Ассоциация между экспрессией опухолевых PD-L1 при предварительном лечении и клиническим ответом			
Статус ответа	PD-L1-положит. кол-во (%)	PD-L1-отрицат. кол-во (%)	Общее кол-во (%)
CR/PR	9(36)	0	9(21)
Не отвеч. на леч-е	16*(64)	17(100)	33(79)
Все пациенты	25	17	42

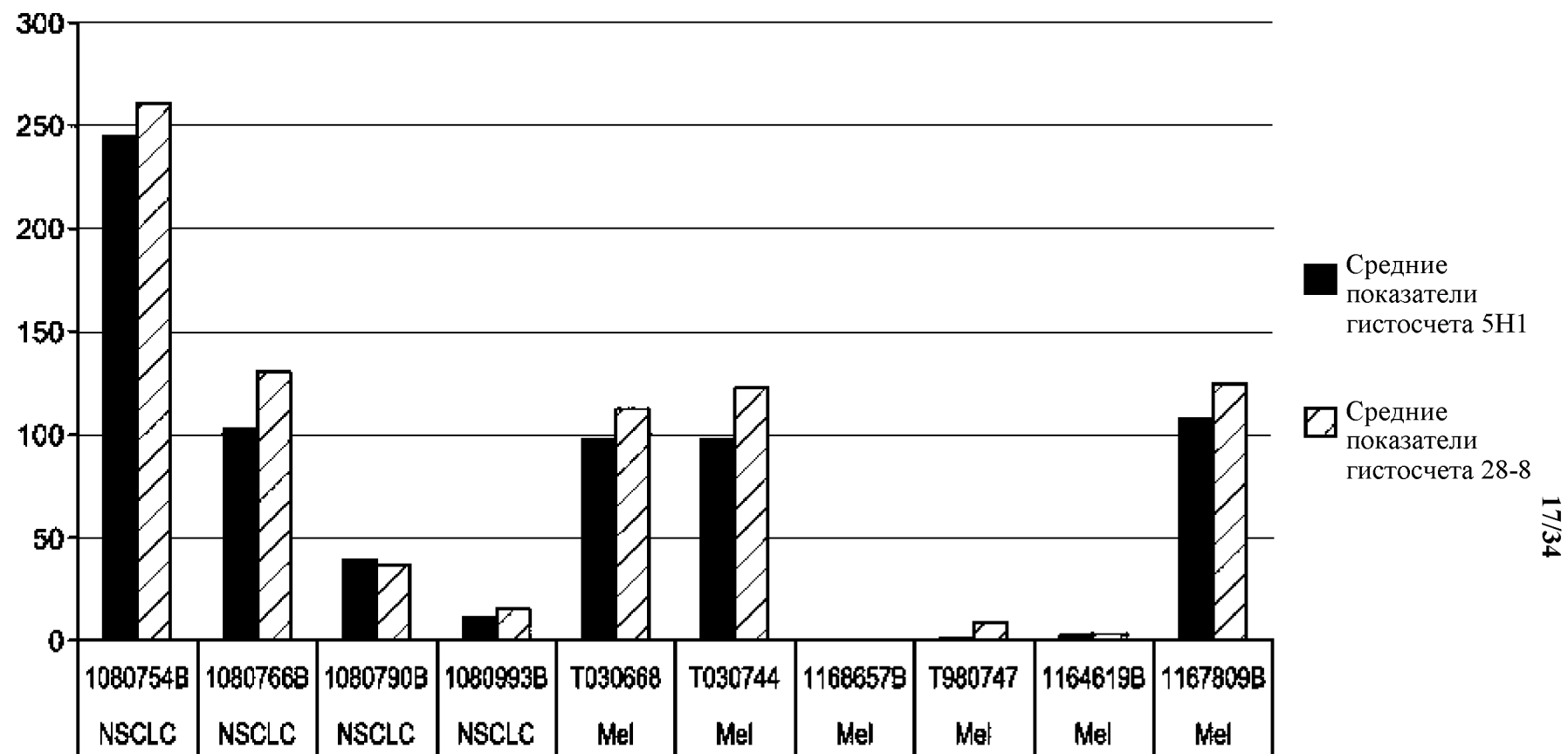
Точный тест Фишера для ассоциаций $P=0,006$.

*Два пациента, обозначенные как не отвечающие на лечения во время анализа данных, до сих пор на апробации.

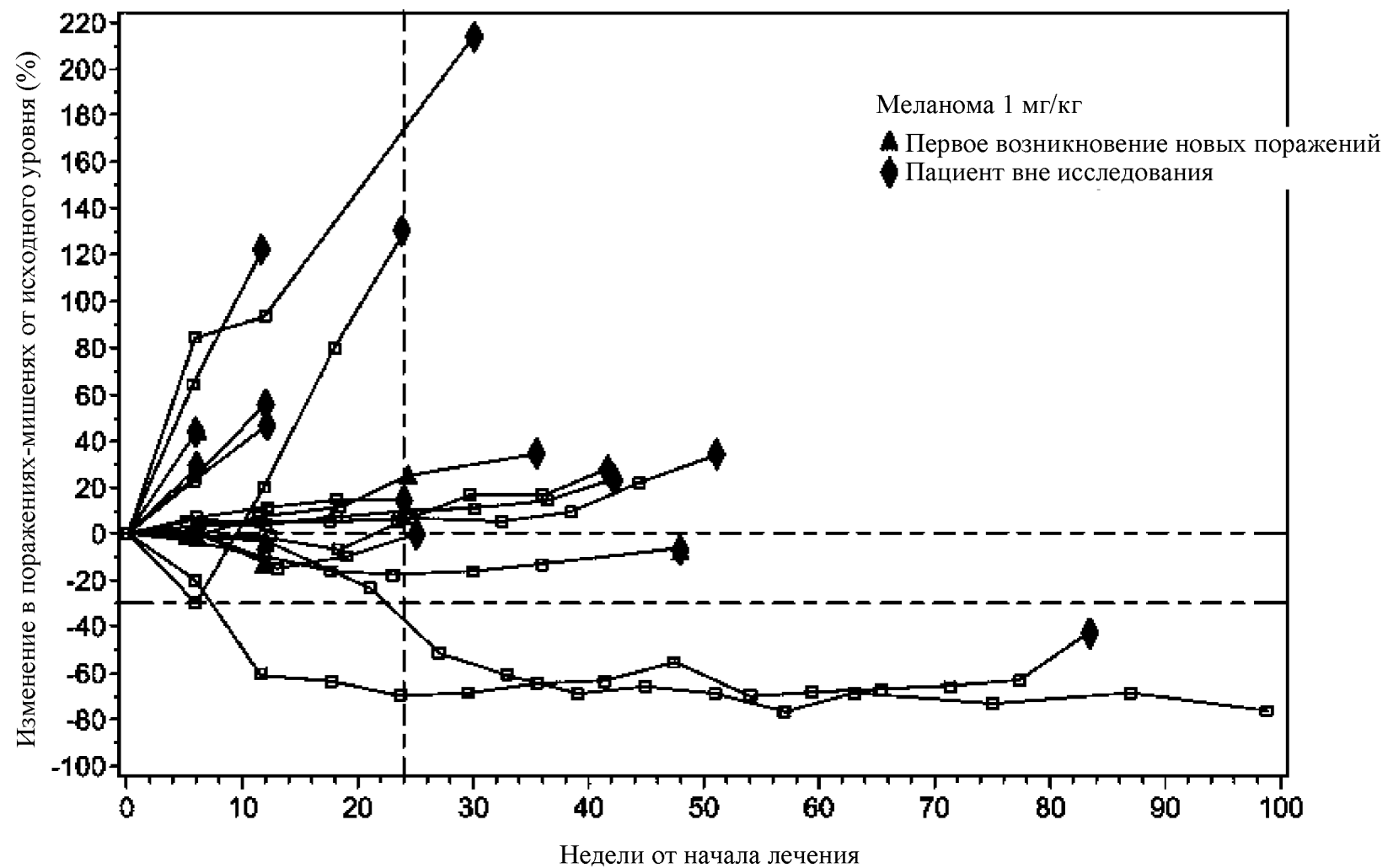
Фиг. 8А



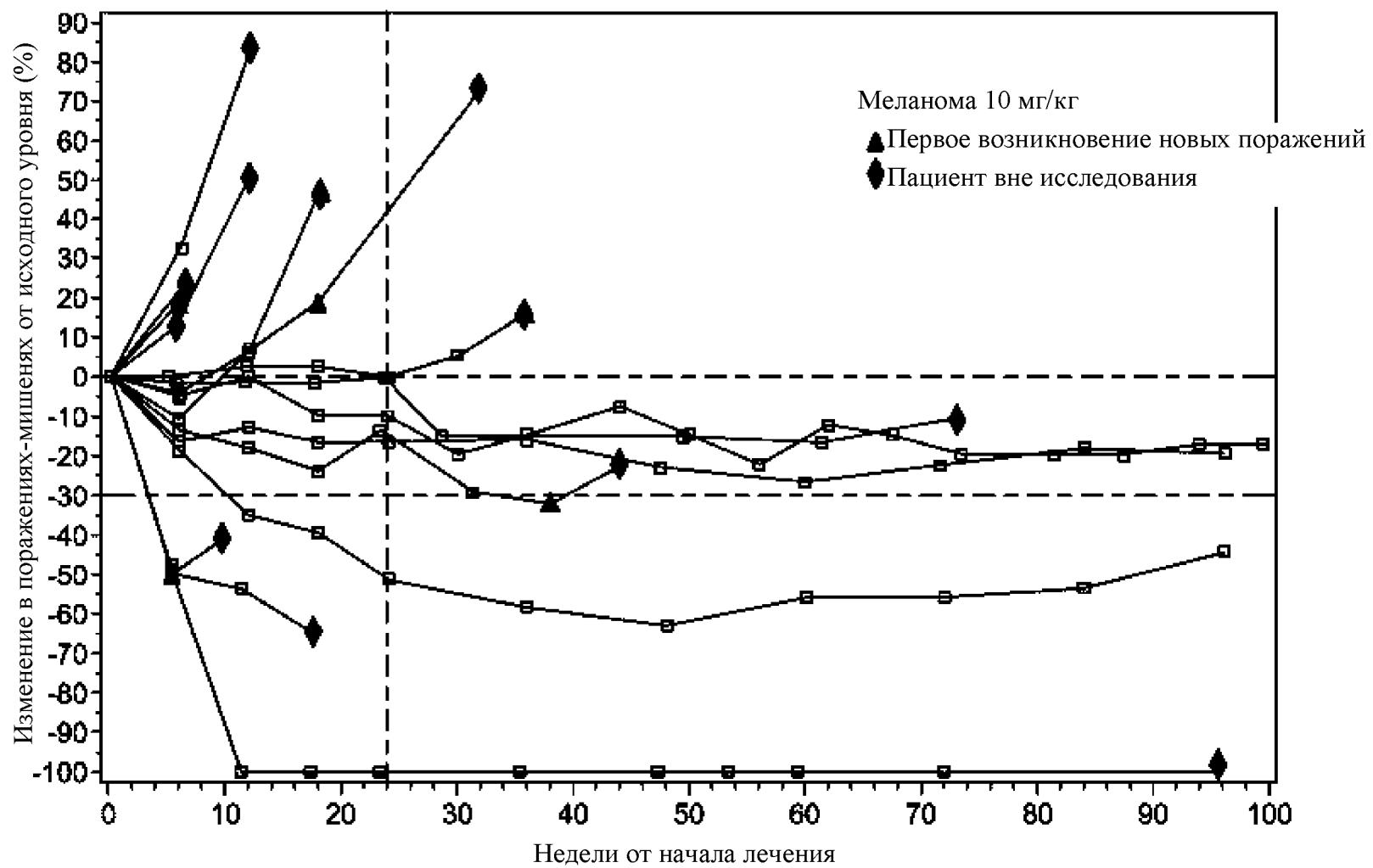
Фиг. 8В



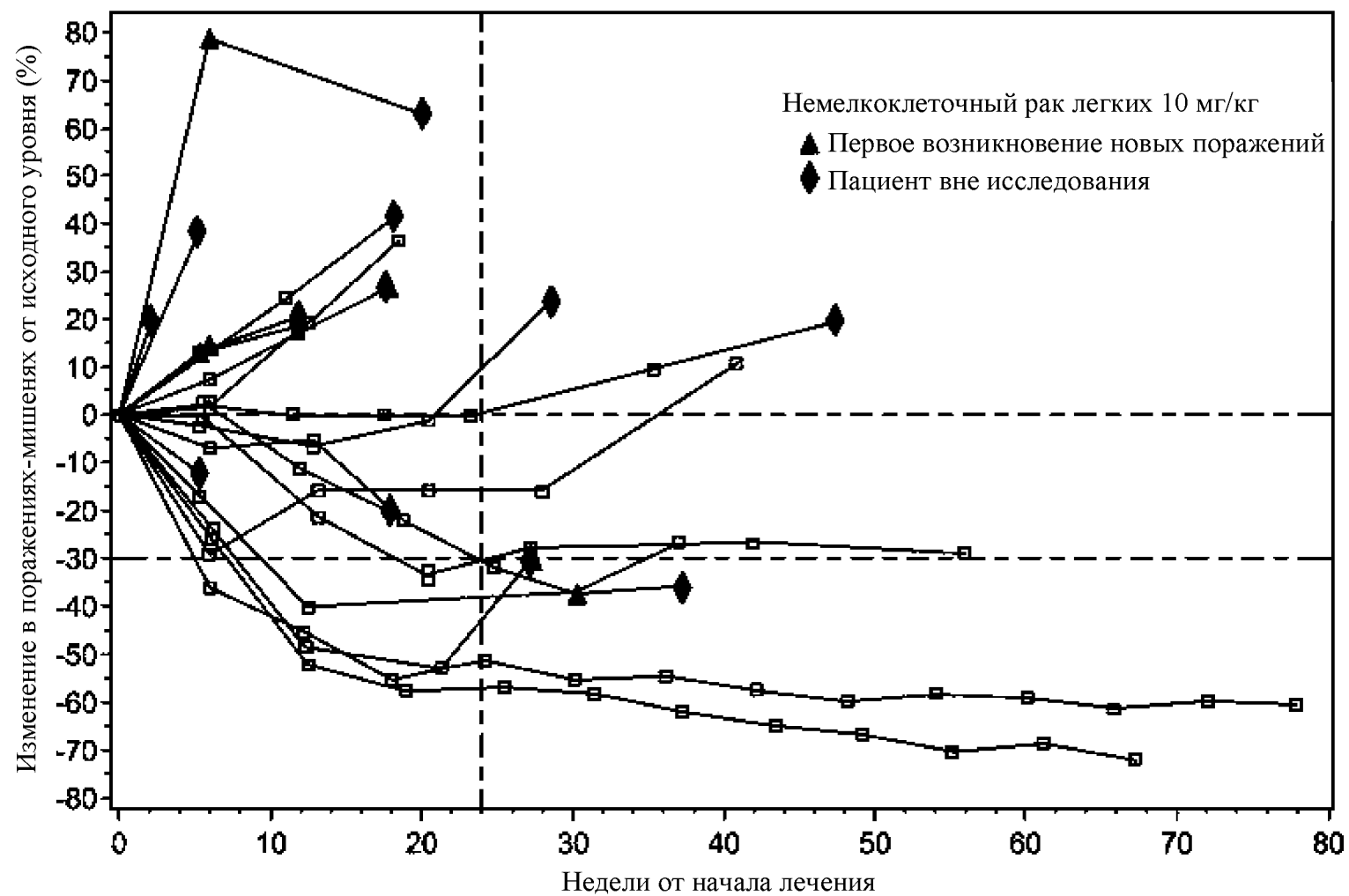
Фиг. 9



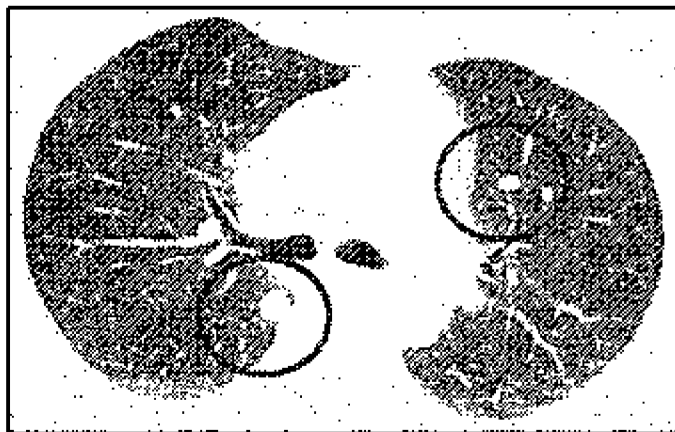
Фиг. 10А



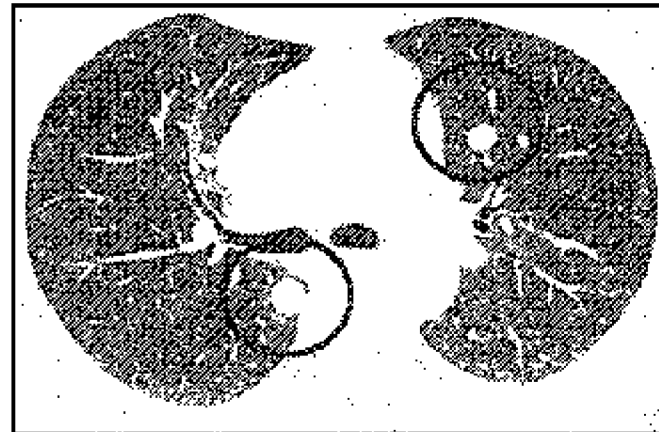
Фиг. 10С



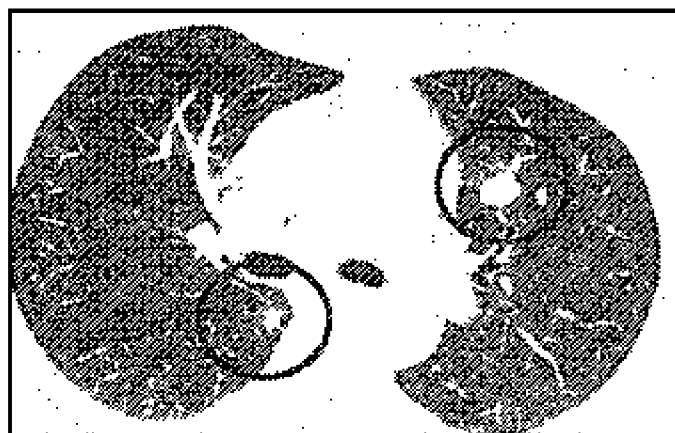
Фиг. 10D



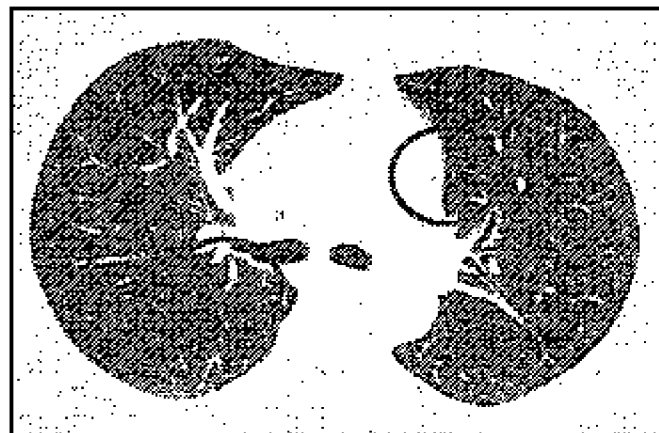
Предшествующее лечение



1,5 месяца



3 месяца



10 месяцев

Фиг. 11

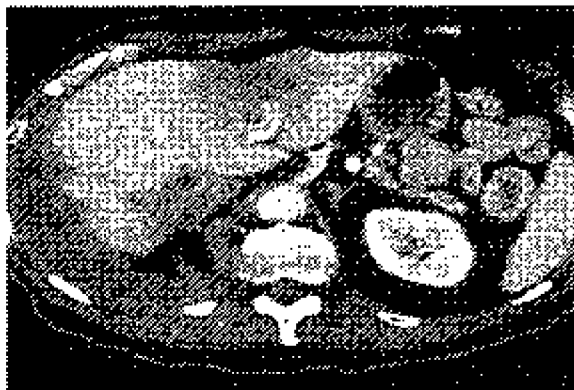


Предшествующее лечение

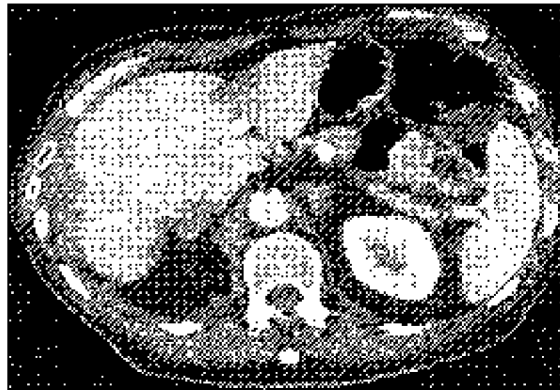
8 месяцев

15 месяцев

Фиг. 12



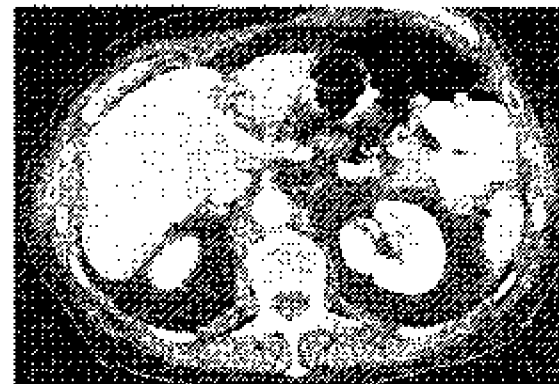
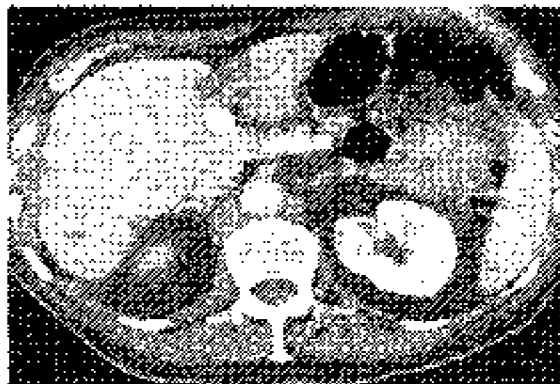
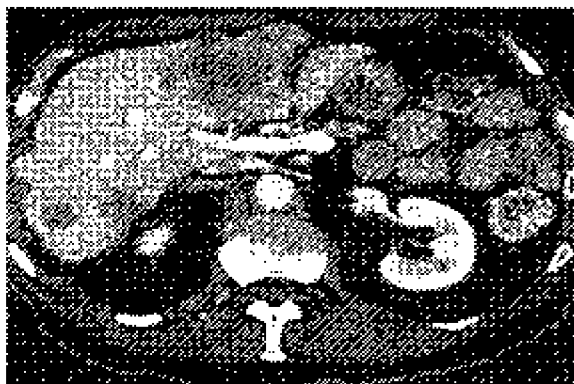
Предшествующее лечение



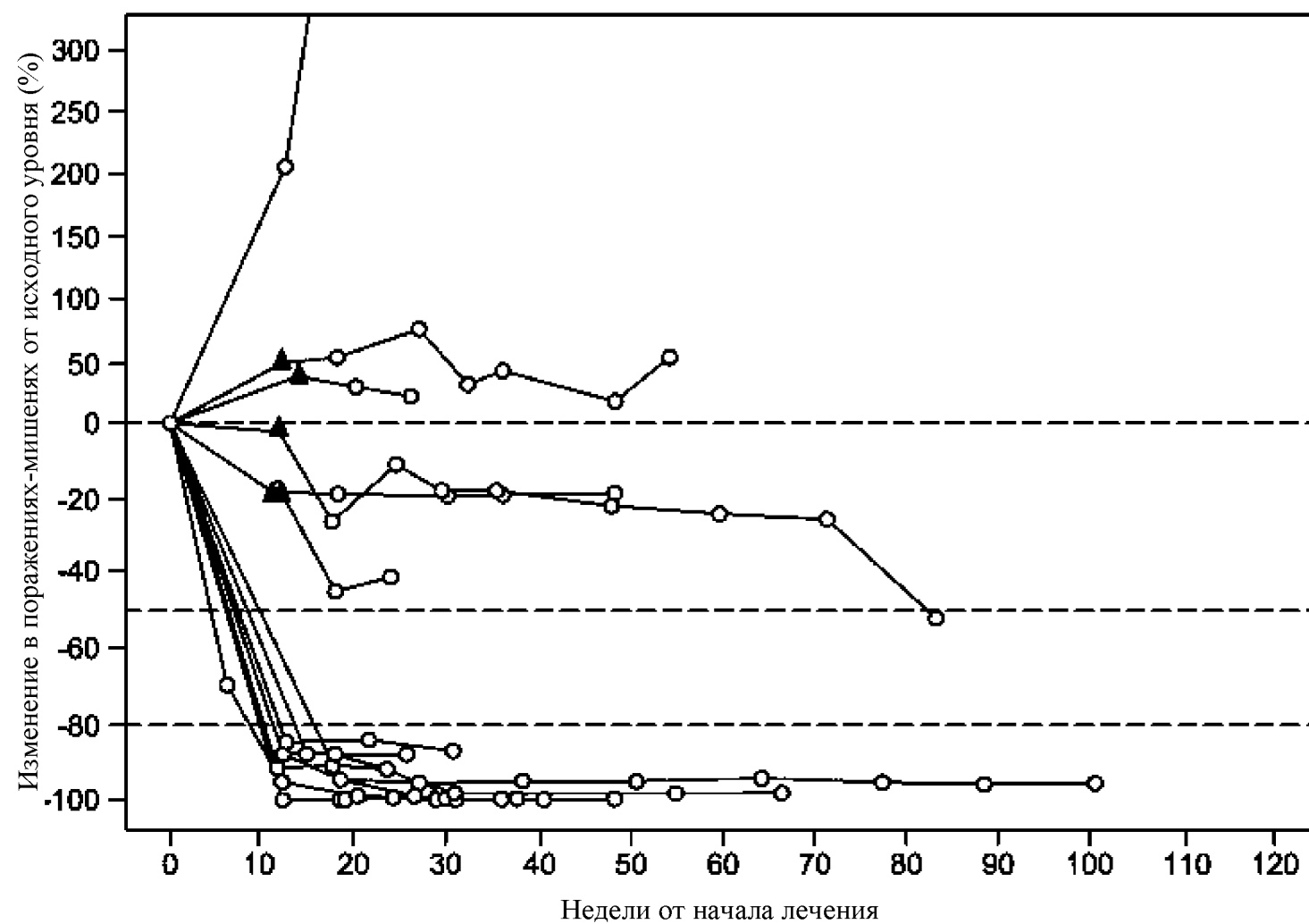
3 месяца



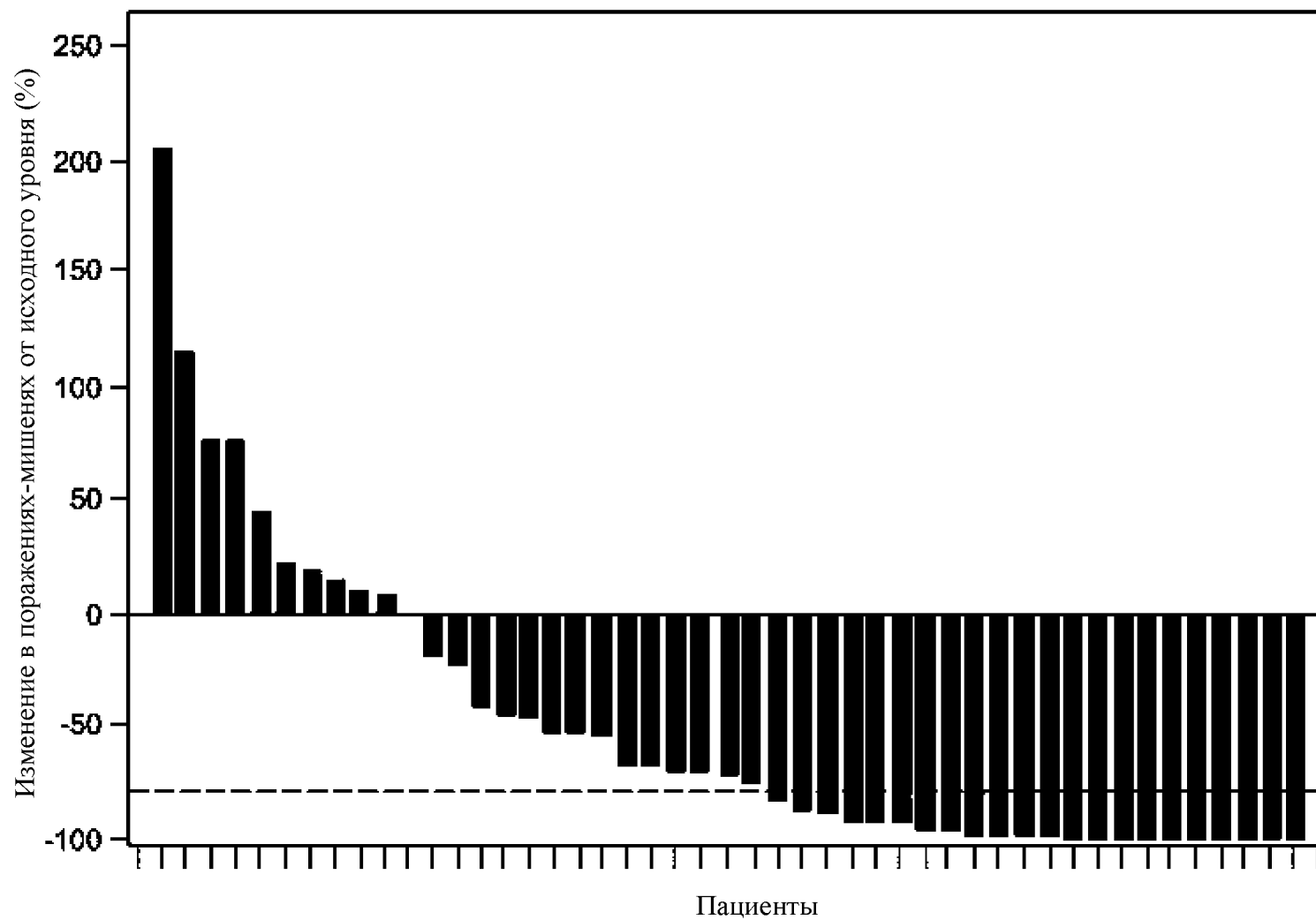
15 месяцев



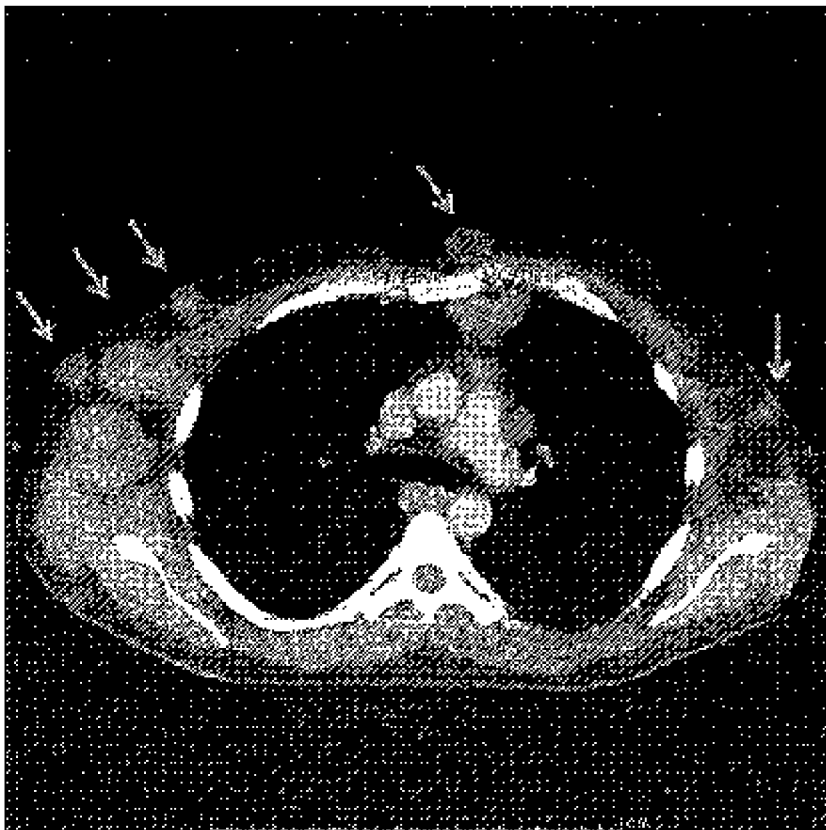
Фиг. 13



Фиг. 14А



Фиг. 14В

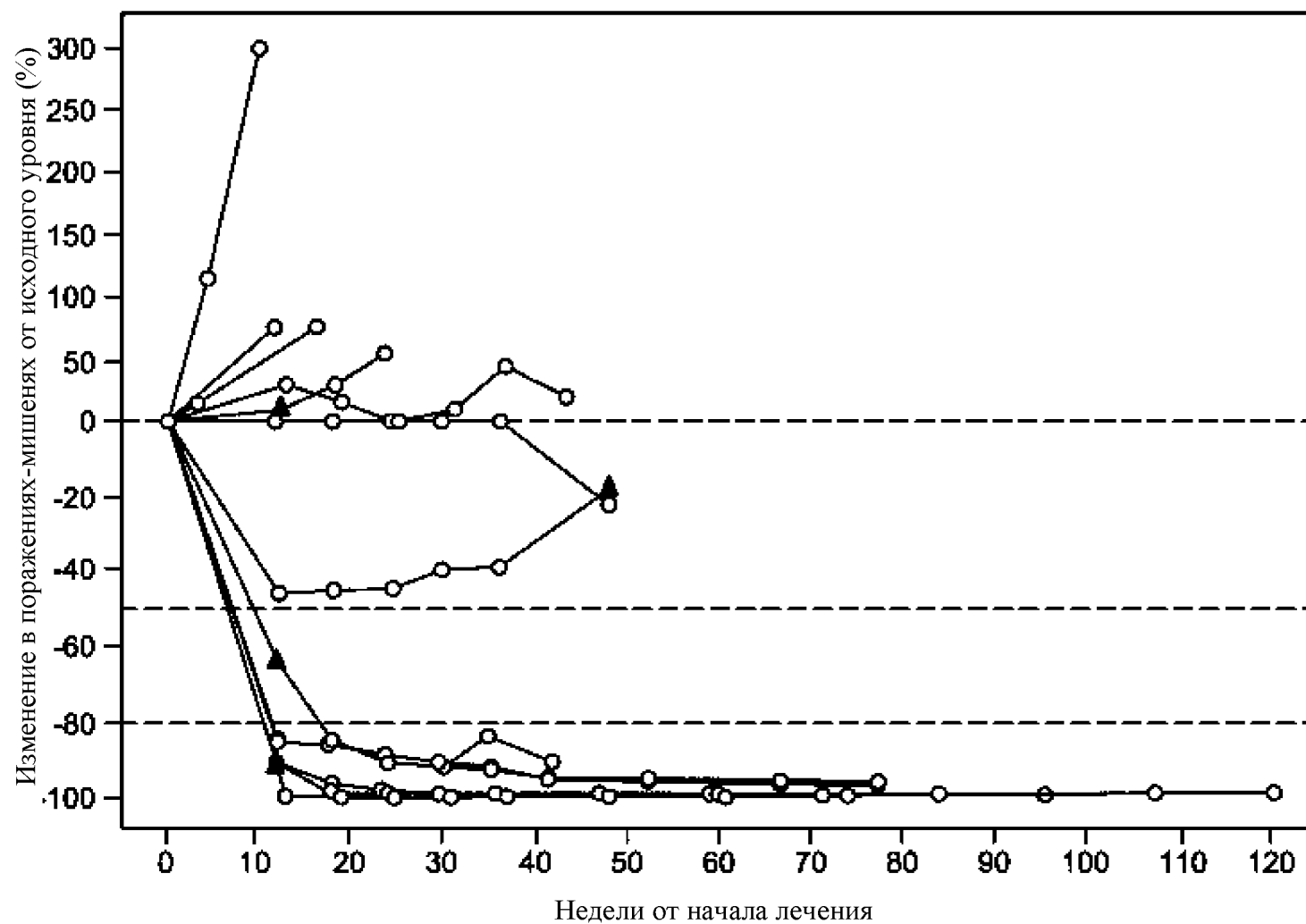


Предшествующее лечение

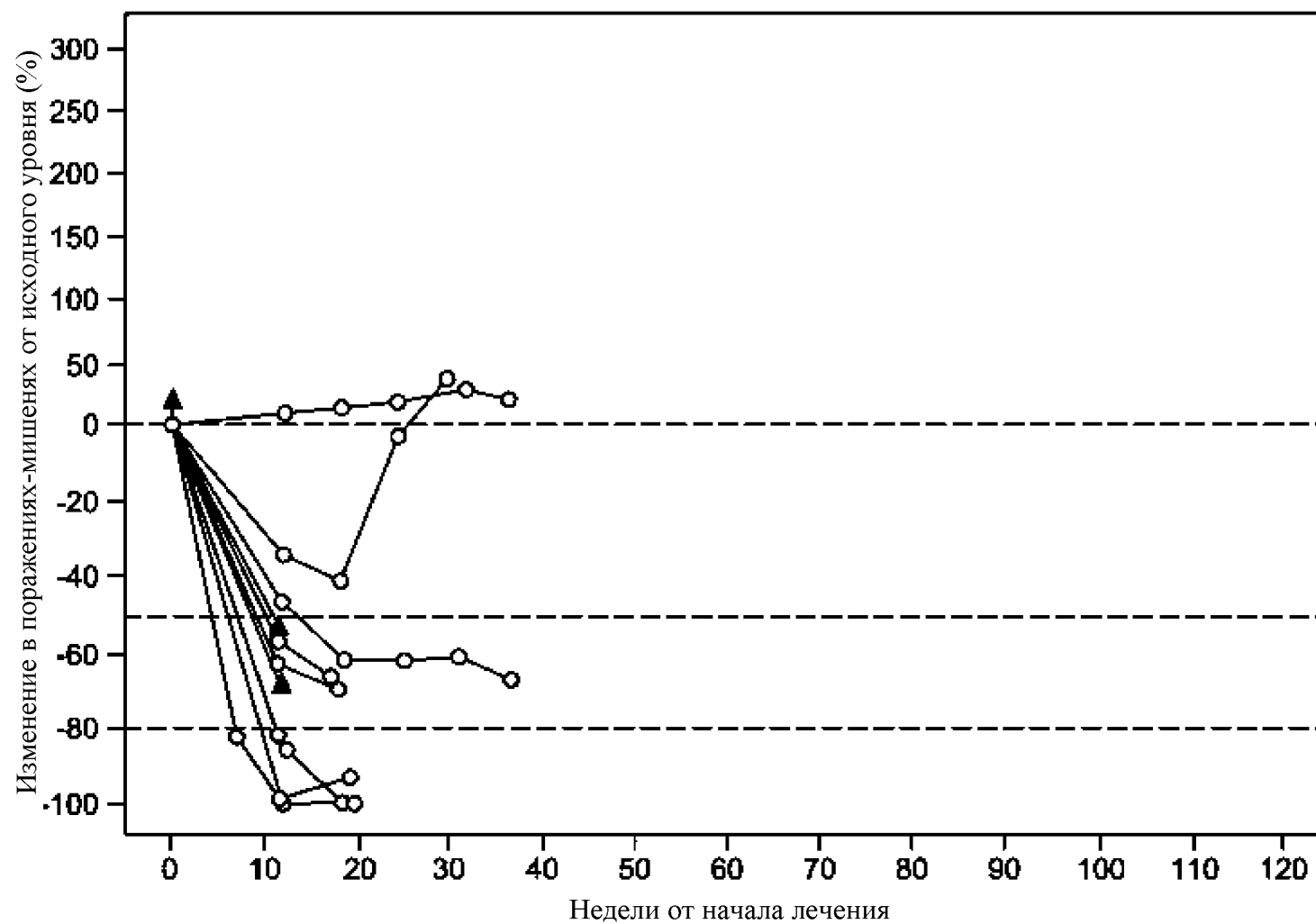


12 недель

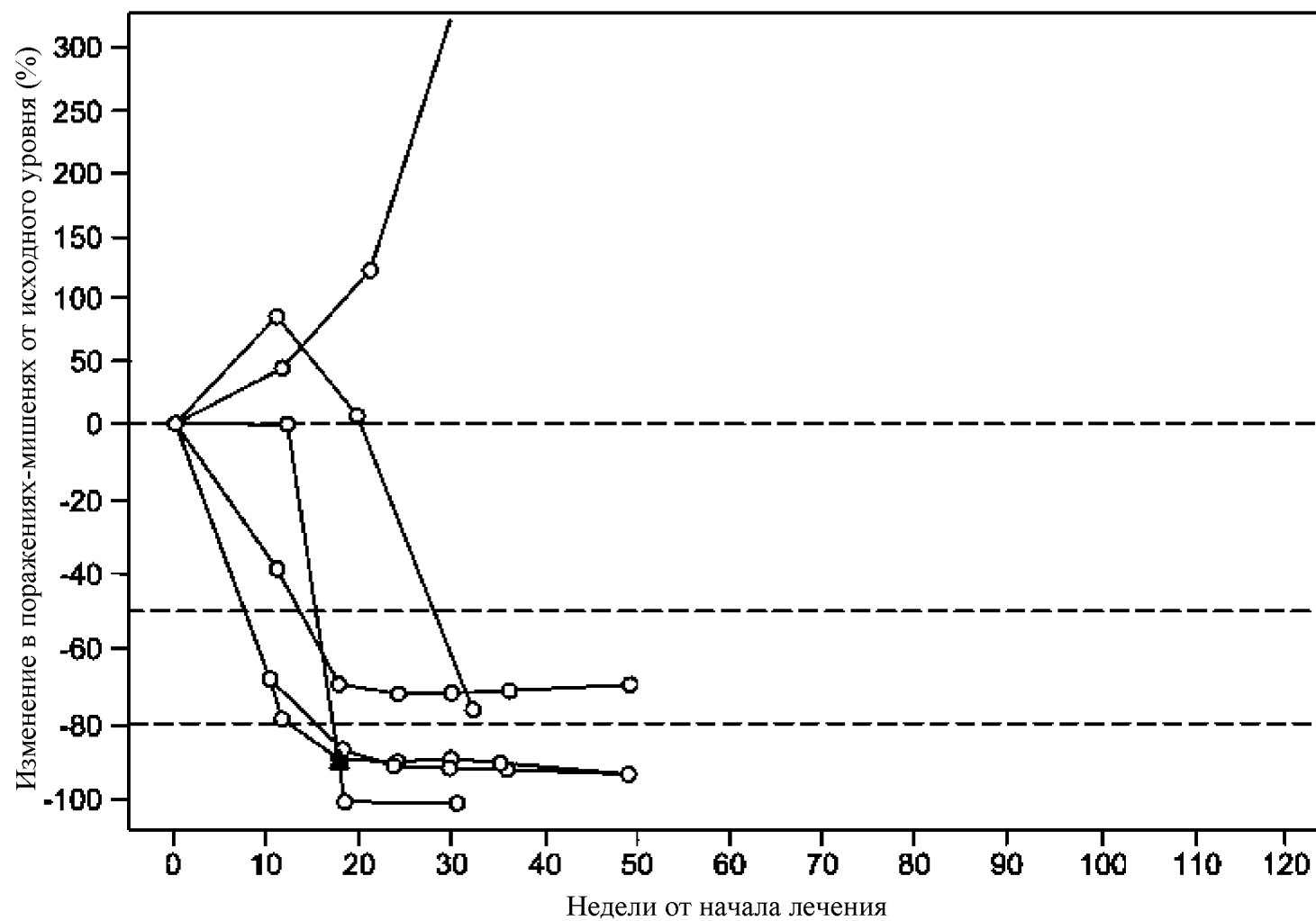
Фиг. 15



Фиг. 16А



Фиг. 16В

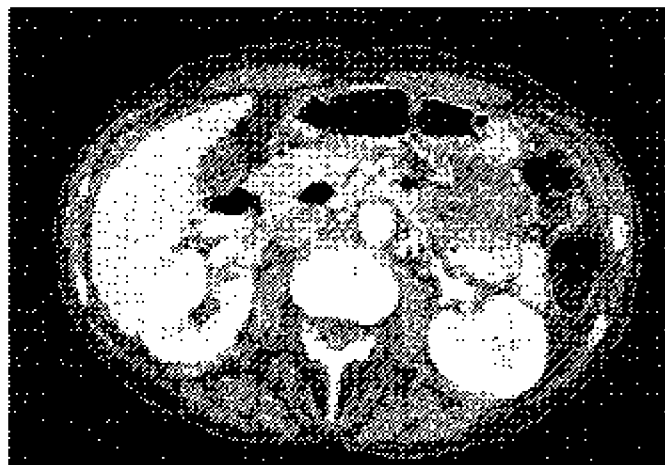


Фиг. 16С

Предшествующее лечение

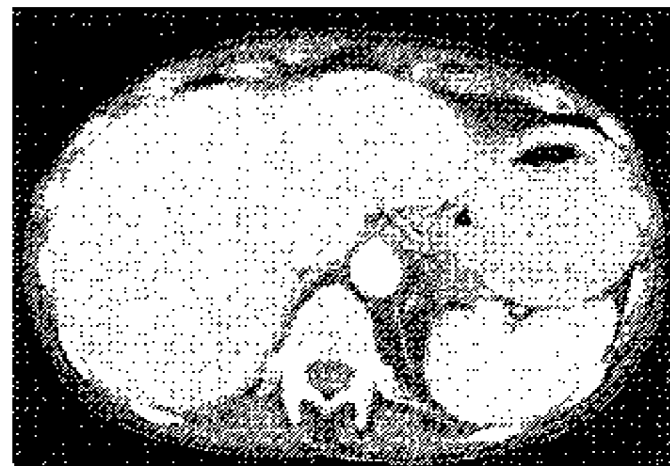


гастральная масса 10 см

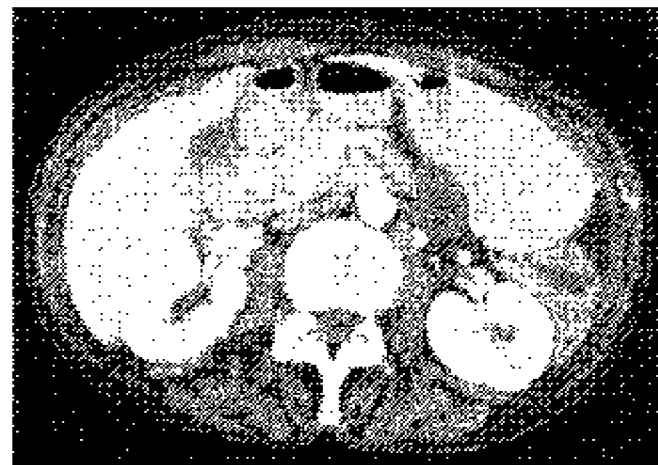


перипанкреатическая масса 5 см

12 недель

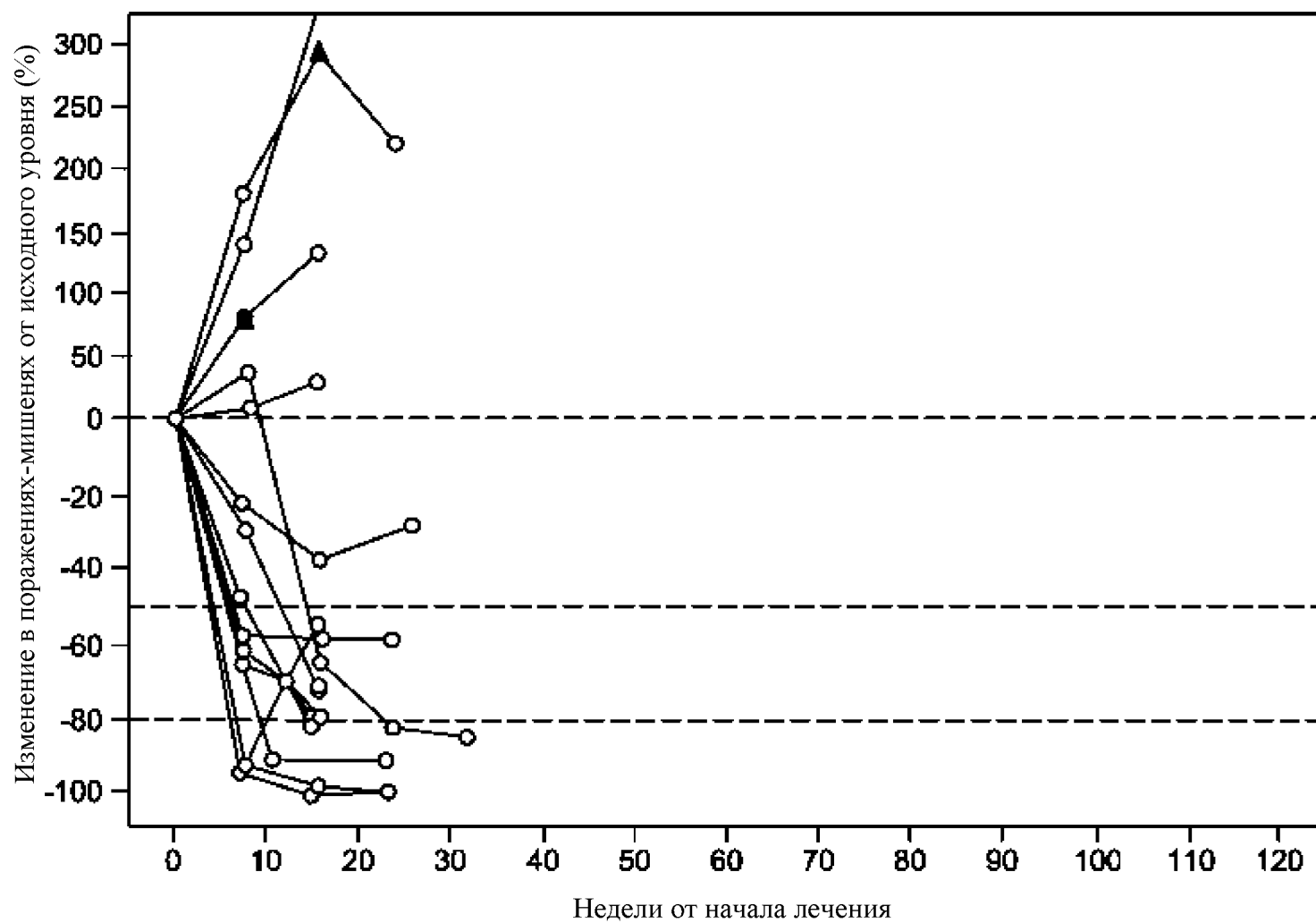


гастральная масса 3,7 см

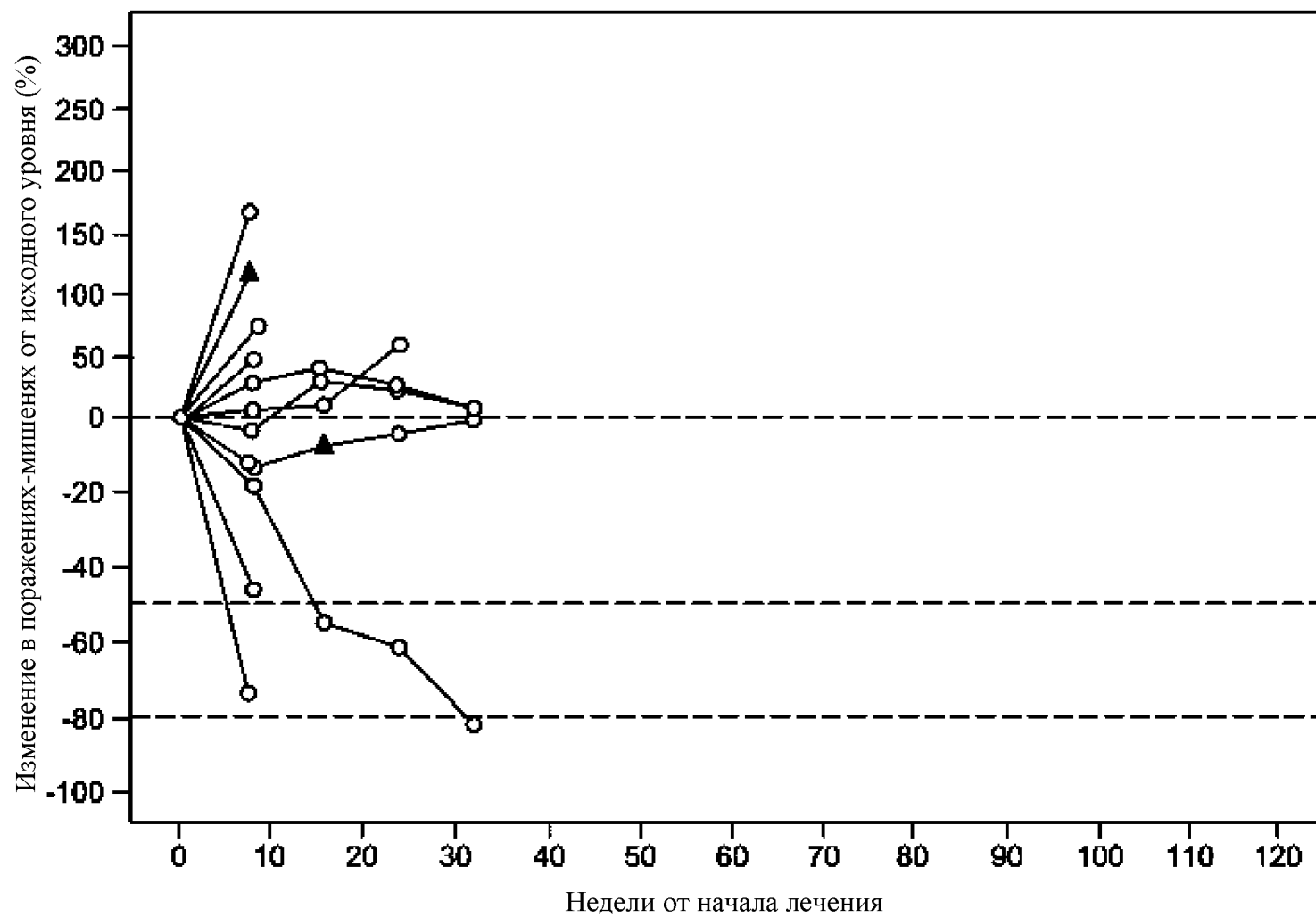


перипанкреатическая масса 3,2 см

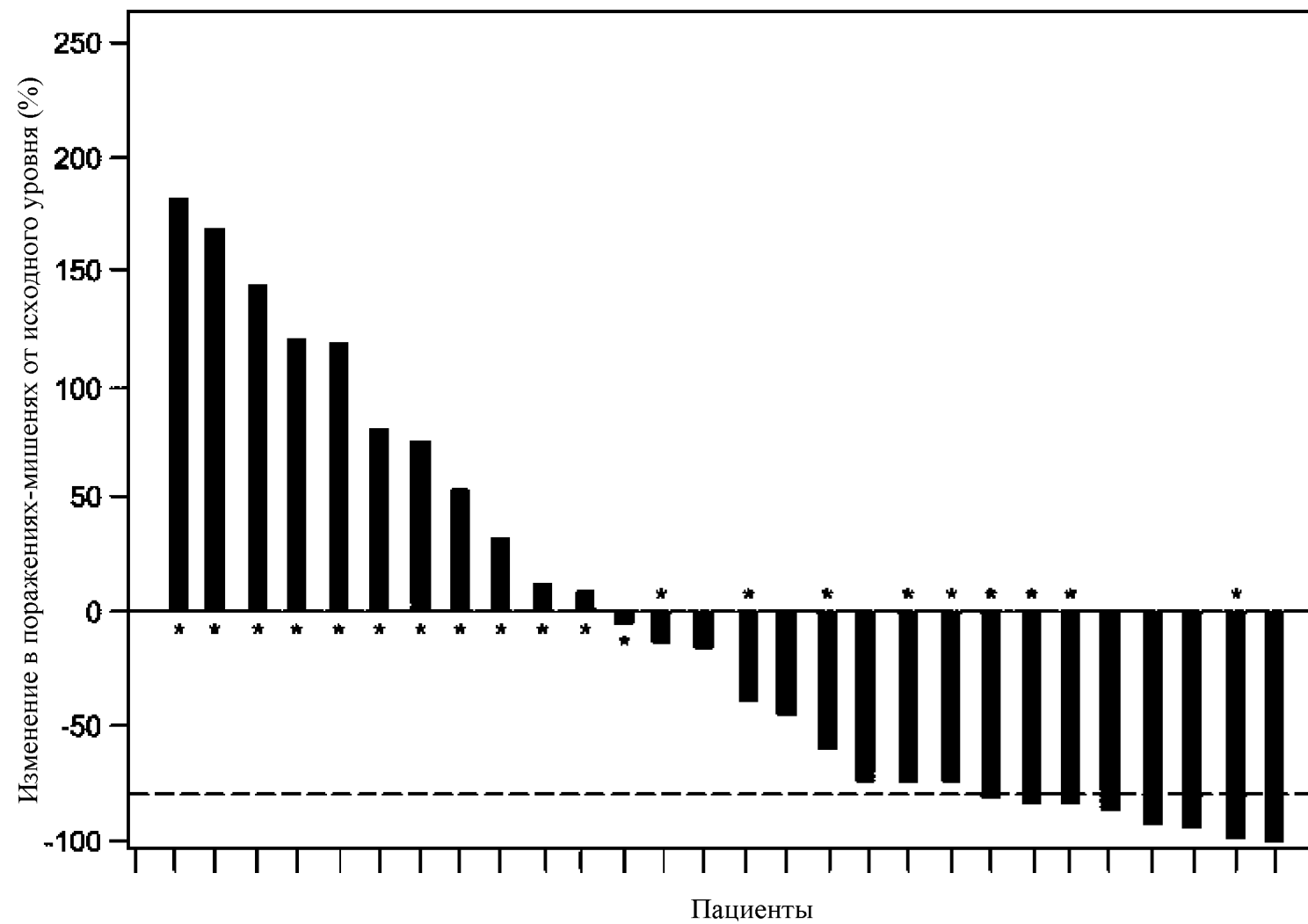
Фиг. 17



Фиг. 18А



Фиг. 18В



Фиг. 18С