

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037890**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.01

(21) Номер заявки
201690633

(22) Дата подачи заявки
2014.10.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ КОМБИНАЦИЮ АНТАГОНИСТА VEGF И АНТИ-CTLA-4 АНТИТЕЛА

(31) **61/892,601; 61/901,596; 61/952,923;
62/055,734**

(32) **2013.10.18; 2013.11.08; 2014.03.14;
2014.09.26**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/061071**

(87) **WO 2015/058048 2015.04.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Иоффе Элла, Лови Израэль, Терстон
Гэвин, Бурова Елена (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2007113648**

LOCKHART ET AL.: "Aflibercept in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer", CLINICAL MEDICINE INSIGHTS: ONCOLOGY, 1 January 2012 (2012-01-01), page 19, XP055163219, DOI: 10.4137/CMO.S7432, the whole document

H.M. KANTARJIAN ET AL.: "Cancer Drugs in the United States: Justum Pretium--The Just Price", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 31, no. 28, 6 May 2013 (2013-05-06), pages 3600-3604, XP055163218, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2013.49.1845, table 1; the whole document

F.S. HODI ET AL.: "Bevacizumab plus Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 2, no. 7, 21 April 2014 (2014-04-21), pages 632-642, XP055163152, ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0053, the whole document

(57) Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело, а также способам их применения. Композиции и способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения разных форм рака и других заболеваний и нарушений, при которых антиангиогенные препараты и/или направленные иммунные ответы могут быть полезны.

B1**037890****037890****B1**

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения рака, а также других заболеваний и нарушений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к терапевтическим комбинациям, включающим антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело, а также способам их применения.

Уровень техники

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является цитокином, участвующим в ангиогенезе. Лиганд VEGF-A взаимодействует с рецептором-1 VEGF (VEGFR1) и VEGFR2, тем самым запуская сигнальный путь ангиогенеза в нормальной и опухолевой сосудистой системе. Известно, что антагонисты VEGF полезны для лечения различных заболеваний и нарушений, включая разные формы рака, глазные заболевания и другие состояния, связанные с избыточным, нежелательным или неадекватным ангиогенезом. Примером антагониста VEGF является афлиберцепт (также известный как ловушка VEGF; продаваемый под торговым названием залтрап® от компании Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY). Афлиберцепт представляет собой химерную молекулу на основе рецептора VEGF, содержащую домен 2 из VEGFR1, слитый с доменом 3 из VEGFR2, который, в свою очередь, связан через шарнирную область с Fc(a) доменом IgG1 человека. Афлиберцепт одобрен для лечения колоректального рака и находится в разработке для лечения и других онкологических состояний. Описание ловушки VEGF имеется, например, в патенте США № 7070959; см. также публикацию Holash et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:11393-11398 (2002).

Ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген-4 (CTLA-4) является членом суперсемейства белков иммуноглобулинов и участвует в отрицательной регуляции Т-клеточной активации. При активации Т-клеток повышается экспрессия CTLA-4, и он конкурирует с CD28 за связывание с B7, тем самым передавая подавляющий сигнал для Т-клеточной активации. Показано, что антитела против CTLA-4 блокируют взаимодействие между CTLA-4 и костимулирующими молекулами B7.1 и B7.2 (CD80 и CD86). Эта блокада снимает опосредованный CTLA-4 ингибирующий сигнал на Т-клетки и тем самым стимулирует естественный иммунный ответ против раковых клеток. Показано, что анти-CTLA-4 антитела клинически эффективны для лечения, например, метастатической меланомы. Иллюстративные анти-CTLA-4 антитела включают ипилимумаб (ервой®, Bristol-Myers Squibb, описано в US 6984720) и тремелидумаб (Pfizer, описано в US 8491895).

Хотя показано, что антагонисты VEGF и анти-CTLA-4 антитела в отдельности являются многообещающими для лечения опухолей и других онкологических состояний, тем не менее необходимы более направленные, эффективные и доказанные потенциальные терапевтические методы для эффективного лечения таких заболеваний и нарушений. Соответственно, в данной области существует неудовлетворенная потребность в новых терапевтических подходах для лечения рака.

Сущность изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим (i) антагонист VEGF; (ii) анти-CTLA-4 антитело и (iii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам ингибирования или ослабления роста опухоли у субъекта. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам продления или пролонгации срока выживания субъекта, имеющего опухоль. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам индукции противоопухолевого иммунитета у субъекта. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. В конкретных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии с данным аспектом изобретения, имел опухоль прежде или в период введения антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела субъекту.

Применительно к аспектам настоящего изобретения, включающим введение антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела субъекту, антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело можно вводить субъекту в отдельных лекарственных формах или в одной лекарственной форме (например, в виде комбинированного препарата). В рамках данных аспектов изобретения предусмотрены различные схемы дозирования и режимы введения, описанные в другом разделе настоящего документа.

Антагонист VEGF, включаемый и используемый в композициях и способах по настоящему изобретению, может представлять собой анти-VEGF антитело, антитело против рецептора VEGF или химерную молекулу на основе рецептора VEGF (ловушку VEGF). В конкретных вариантах осуществления антагонист VEGF представляет собой афлиберцепт.

Анти-CTLA-4 антитело, включаемое и используемое в композициях и способах по настоящему изобретению,

бретению, может представлять собой антагонистическое антитело. В конкретных вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб или тремелиумаб.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения станут понятны из следующего далее подробного описания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1-3 иллюстрируют результаты роста опухолей и выживаемости у мышей с имплантированными клетками опухоли Colon-26 в день 0 и после лечения указанными комбинациями молекул путем инъекции в дни 3, 7, 10, 14 и 18 ("модель раннего лечения опухоли").

На фиг. 1 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации.

На фиг. 2 представлен объем опухолей (в мм³) у отдельных мышей в каждой экспериментальной группе в день 22 после имплантации.

На фиг. 3 представлен процент выживаемости мышей в различных экспериментальных группах в различные моменты времени после имплантации. Направленные вверх стрелки вдоль оси X указывают время терапевтических инъекций. "IgG" представляет собой изотипический контроль IgG2; "Fc" представляет собой контроль Fc человека; "hVGT" представляет собой афлиберцепт (также называемый ловушкой VEGF); "анти-CTLA-4" представляет собой антитело IgG2b клона 9D9 против CTLA-4 мыши.

Фиг. 4A, 4B иллюстрируют результаты измерения объемов опухолей у мышей, которые не имели опухолей после первоначальной имплантации опухолей и лечения с помощью указанных комбинаций молекул, и которым затем были повторно имплантированы клетки опухолей Colon-26 в день 60 после первоначальной имплантации опухолей (без дополнительного лечения).

На фиг. 4A показан объем опухолей (в мм³) у отдельных мышей в указанных экспериментальных группах (или нативных [не подвергавшихся воздействию] контролей) в день 14 после повторной имплантации опухолей.

На фиг. 4B показан объем опухолей (в мм³) у отдельных мышей в указанных экспериментальных группах (или нативных [не подвергавшихся воздействию] контролей) в день 32 после повторной имплантации опухолей. "IgG" представляет собой изотипический контроль IgG2; "Fc" представляет собой контроль Fc человека; "hVGT" представляет собой афлиберцепт (также называемый ловушкой VEGF); "анти-CTLA-4" представляет собой антитело IgG2b клона 9D9 против CTLA-4 мыши.

Фиг. 5-7 иллюстрируют результаты роста опухолей и выживаемости у мышей с имплантированными клетками опухоли Colon-26 в день 0 и после лечения указанными комбинациями молекул путем инъекции в дни 11, 15, 17, 21 и 25 ("модель позднего лечения опухоли").

На фиг. 5 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации.

На фиг. 6 представлен объем опухолей (в мм³) отдельных мышей в указанных экспериментальных группах в день 70 после имплантации.

На фиг. 7 представлен процент выживаемости мышей в различных экспериментальных группах в различные моменты времени после имплантации. Направленные вверх стрелки вдоль оси X указывают время терапевтических инъекций. "IgG" представляет собой изотипический контроль IgG2; "Fc" представляет собой контроль Fc человека; "hVGT" представляет собой афлиберцепт (также называемый ловушкой VEGF); "анти-CTLA-4" представляет собой антитело IgG2b клона 9D9 против CTLA-4 мыши.

Фиг. 8-12 иллюстрируют рост, регрессию, некроз и гистологические параметры опухолей у мышей, получавших указанную простую или комбинированную терапию, либо контрольные комбинации, начиная через семь дней после имплантации опухоли Colon-26.

На фиг. 8 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации. Направленные вверх стрелки вдоль оси X указывают время терапевтических инъекций.

На фиг. 9 представлен объем опухолей (в мм³) отдельных мышей в каждой экспериментальной группе в день 21 после имплантации.

Фиг. 10 демонстрирует степень регрессии опухолей (оцененную в баллах по шкале от 1 до 4) у мышей в каждой группе лечения в день 21. Регрессию опухолей оценивали в баллах на основании доли опухолевой массы, подвергшейся некрозу, опухолевым/околоопухолевым инфильтратам или фиброзу, наблюдаемым в окрашенных H&E срезах. 1 балл = 0-25%, 2 балла = 25-50%, 3 балла = 50-75%, 4 балла = 75-100%.

Фиг. 11 демонстрирует степень некроза опухолей (оцененную в баллах по шкале от 1 до 4) для опухолей, извлеченных из мышей в каждой группе лечения в день 21 и подвергнутых гистопатологическому исследованию. Баллы присваивали на основании процентной доли некротических тканей в опухолевой массе. 1 балл = 0-25%, 2 балла = 25-50%, 3 балла = 50-75%, 4 балла = 75-100%.

Фиг. 12, панели А-С демонстрируют степень инфильтрации воспалительных клеток, фиброз опухолей и митотические фигуры, соответственно, у мышей в каждой группе лечения в день 21.

Панель А демонстрирует степень инфильтрации воспалительных клеток (оцененную в баллах по шкале от 1 до 3). 1 балл = несколько небольших агрегатов/очагов клеток, 2 балла = более крупные очаги

воспалительных клеток, 3 балла = сливающиеся очаги, часто становящиеся локально обширными инфильтратами лимфогистоцитарных клеток, находящихся на границе и внутри опухолевой массы. Панель В демонстрирует степень фиброза опухолей (оцененную в баллах по шкале от 0 до 2). Оценка в баллах фиброза была основана на результатах окраски трихромом по Массону: 0 баллов = редкие или единичные коллагеновые волокна, рассеянные по всей опухоли, либо как часть стромы опухоли или ранее существующий коллаген вокруг сосудов или в ассоциации с другими структурами (например, скелетными мышцами); либо в областях некроза, где единичные тонкие коллагеновые нити считали частью ранее существующей стромы опухоли; 1 балл = очаговое или обширное очаговое отложение тонких коллагеновых волокон, ограниченное краями опухоли, часто перекрывающееся с областями опухолевых/околоопухолевых инфильтратов или возле областей некроза; 2 балла = многоочаговые или локально обширные области отложений коллагеновых волокон, описанных для 1 балла. Фиброзную ткань, образующую концентрические области вокруг опухоли, или ранее существующие коллагеновые волокна в дерме не включали в оценку. Панель С демонстрирует митотические фигуры для отдельных групп лечения. Митотические фигуры выражены в виде суммы митотических фигур, наблюдаемых в 5 подходящих не перекрывающихся полях зрения микроскопа под большим увеличением (hpf) 40X на каждую опухоль.

Фиг. 13 и 14 иллюстрируют результаты роста опухолей и выживаемости у мышей с имплантированными клетками опухоли Colon-26 в день 0 и после лечения указанными анти-CTLA-4 антителами (имеющими изотипы IgG2a или IgG2b) или контрольными по изотипу антителами после образования опухолей в дни 12, 15, 19, 22, 26, 30, 33, 37 и 41 ("модель позднего лечения опухоли").

На фиг. 13 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации. Направленные вверх стрелки вдоль оси X указывают время терапевтических инъекций.

На фиг. 14 представлен процент выживаемости мышей в различных экспериментальных группах в различные моменты времени после имплантации.

Фиг. 15-17 иллюстрируют результаты роста опухолей и выживаемости у мышей с имплантированными клетками опухоли MC38 в день 0 и после лечения указанными анти-CTLA-4 антителами (имеющими изотипы IgG2a или IgG2b) или контрольными по изотипу антителами после образования опухолей в дни 10, 14, 17, 21 и 24 ("модель позднего лечения опухоли").

На фиг. 15 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации. Направленные вверх стрелки вдоль оси X указывают время терапевтических инъекций.

На фиг. 16 представлен объем опухолей (в мм³) у отдельных мышей в указанных экспериментальных группах в день 21 после имплантации.

На фиг. 17 представлен процент выживаемости мышей в различных экспериментальных группах в различные моменты времени после имплантации.

Фиг. 18 и 19 иллюстрируют результаты роста опухолей у мышей с имплантированными клетками опухоли MC38 в день 0 и после лечения указанными комбинациями молекул путем инъекций в дни 15, 17, 23, 25, 27, 33, 35 и 37 ("модель позднего лечения опухоли").

На фиг. 18 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации.

На фиг. 19 представлен объем опухолей (в мм³) у отдельных мышей в указанных экспериментальных группах в день 24 после имплантации. "IgG2a" представляет собой изотипический контроль IgG2a; "Fc" представляет собой контроль Fc человека; "hVGT" представляет собой афлиберцепт (также называемый ловушкой VEGF); "анти-CTLA-4 IgG2a" представляет собой антитело против CTLA-4 мыши, имеющее изотип IgG2a.

Фиг. 20 и 21 иллюстрируют результаты роста опухолей у мышей с имплантированными клетками опухоли MC38 в день 0 и после лечения указанными комбинациями молекул путем инъекций в дни 10, 14, 18, 21 и 25 ("модель позднего лечения опухоли").

На фиг. 20 представлен объем опухолей (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные моменты времени после имплантации.

На фиг. 21 представлен объем опухолей (в мм³) у отдельных мышей в указанных экспериментальных группах в день 18 после имплантации.

Фиг. 22 иллюстрирует результаты роста опухолей (объем опухолей [в мм³]) у мышей с имплантированными клетками опухоли MC38 в день 0 и после лечения указанными комбинациями молекул путем инъекций в дни 9, 13, 16 и 20 ("модель позднего лечения опухоли").

Фиг. 23-25 демонстрируют относительные уровни экспрессии генов ангиогенных маркеров Dll4 (фиг. 23), Ang2 (фиг. 24) и Robo4 (фиг. 25), измеренные методом ПЦР в реальном времени, в сформировавшихся опухолях, полученных от мышей после лечения указанными комбинациями молекул.

Фиг. 26 демонстрирует относительный уровень экспрессии Е-селектина, измеренный методом ПЦР в реальном времени, в сформировавшихся опухолях, полученных от мышей после лечения указанными комбинациями молекул.

Фиг. 27 и 28 демонстрируют относительные уровни экспрессии CD8 и CD247 соответственно, из-

меренные методом ПЦР в реальном времени, в сформировавшихся опухолях, полученных от мышей после лечения указанными комбинациями молекул; экспрессия которых отражает уровень экспрессии инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, в различных группах лечения.

Фиг. 29 и 30 демонстрируют относительные уровни экспрессии воспалительных цитокинов IFN γ и TNF α соответственно, измеренные методом ПЦР в реальном времени, в сформировавшихся опухолях, полученных от мышей после лечения указанными комбинациями молекул.

Фиг. 31-33 демонстрируют относительные уровни экспрессии Itgam (CD11b), Emr1 (F4/80) и Itgax (CD11c) соответственно, измеренные методом ПЦР в реальном времени, в сформировавшихся опухолях, полученных от мышей после лечения указанными комбинациями молекул; экспрессия которых отражает уровень инфильтрации миелоидных клеток (миелоидных клеток, макрофагов и дендритных клеток, соответственно) в различных группах лечения.

Подробное описание

Прежде чем перейти к описанию настоящего изобретения, следует понимать, что данное изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, служит исключительно целям описания лишь конкретных вариантов осуществления и не должна быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится данное изобретение. Используемый в настоящем документе термин "примерно" применительно к конкретному заявленному числовому значению означает, что данное значение может отклоняться от заявленного значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "примерно 100" включает 99 и 101, а также все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

При том что на практике настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Антагонисты VEGF.

Используемый в настоящем документе термин "антагонист VEGF" означает любую молекулу, которая блокирует, уменьшает или препятствует нормальной биологической активности фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) или рецептора VEGF. Антагонисты VEGF включают молекулы, которые препятствуют взаимодействию между VEGF и естественным рецептором VEGF, например молекулы, которые связываются с VEGF или рецептором VEGF и предотвращают или иным образом мешают взаимодействию между VEGF и рецептором VEGF. Конкретные иллюстративные антагонисты VEGF включают анти-VEGF антитела (например, бевацизумаб [авастин®]), антитела против рецептора VEGF (например, анти-VEGFR1 антитела, анти-VEGFR2 антитела и т.д.) и химерные молекулы на основе рецептора VEGF (также называемые в настоящем документе "ловушки VEGF").

Химерные молекулы на основе рецептора VEGF включают химерные полипептиды, которые содержат два или более иммуноглобулин (Ig)-подобных домена рецептора VEGF, такого как VEGFR1 (также называемого Flt1) и/или VEGFR2 (также называемого Flk1 или KDR), и также могут содержать мультимеризующий домен (например, Fc-домен, способствующий мультимеризации [например, димеризации] двух или более химерных полипептидов). Иллюстративная химерная молекула на основе рецептора VEGF представляет собой молекулу, называемую VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) (также известную как афлиберцепт), которая закодирована нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1. VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) содержит три компонента: (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) компонент мультимеризации ("Fc Δ C1 (a)"), содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2 (C-концевая аминокислота в SEQ ID NO: 11 [т.е. K458] может быть включена или не включена в антагонист VEGF, используемый в способах по изобретению; см., например, патент США № 7396664). Аминокислоты 1-26 из SEQ ID NO: 2 представляют собой сигнальную последовательность.

Анти-CTLA-4 антитела.

Используемый в настоящем документе термин "анти-CTLA-4 антитело" означает любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген-4 (CTLA-4). CTLA-4 человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Неограничивающие иллюстративные анти-CTLA-4 антитела, которые можно использовать и включать в способы и композиции по настоящему изобретению, включают, например, ипилимумаб (ервой®, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) и тремелидумаб (Pfizer, New York, NY). Другие анти-CTLA-4 антитела, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают любые из анти-CTLA-4 антител, описанных, например, в патентах США № 6682736, 6984720, 7605238, 8491895, 8318916,

8263073, 8143379, а также приведенных в них ссылках.

Антитела.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" (например, анти-VEGF антитело, антитело против рецептора VEGF, анти-CTLA-4 антитело и т.д.) включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). В типичном антителе каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения области FR анти-IL-4R антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным образом или искусственно модифицированными. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определять на основании параллельного анализа двух или более CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антитела. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любые природные, получаемые ферментативным путем, синтетические или генетически модифицированные полипептиды или гликопротеины, которые специфически связывают антиген, с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные генно-инженерные методы, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или может быть легко получена, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляциям с использованием химических или молекулярно-биологических методов, например, для организации одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификаций, добавлений или делеций аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) $F(ab')_2$ -фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такие как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-тела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также попадают под используемое в настоящем документе определение "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну область CDR, которая примыкает или находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, в которых домен V_H связан с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно найти в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают (i) V_H - C_{H1} ; (ii) V_H - C_{H2} ; (iii) V_H - C_{H3} ; (iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ; (v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_{H1} ; (ix) V_L - C_{H2} ; (x) V_L - C_{H3} ; (xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ; (xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены либо могут быть непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частич-

ной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, результатом чего является гибкая или полугибкая связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, за счет дисульфидной связи(ей)).

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также включает мультиспецифические (например, биспецифические) антитела. Мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержат по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с разными эпитопами на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела можно адаптировать для использования в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием обычных методов, доступных в данной области. Например, настоящее изобретение охватывает способы, включающие использование биспецифических антител, в которых одно плечо иммуноглобулина является специфическим для VEGF, VEGFR, CTLA-4 или их фрагмента и другое плечо иммуноглобулина является специфическим для второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим фрагментом. Иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слитые продукты IgG-scFv, двойной переменный домен (DVD)-Ig, квадруму, "выступы во впадины", общую легкую цепь (например, общую легкую цепь по принципу "выступы во впадины" и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED) тело, "лейциновые застежки", Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (см., например, публикацию Klein et al. 2012, mAbs, 4:6, 1-11 и приведенные в ней ссылки для обзора вышеуказанных форматов). Биспецифические антитела также можно конструировать с использованием конъюгации пептида/нуклеиновой кислоты, например, когда неприродные аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем за счет самосборки образуют мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, могут представлять собой человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулинов человека. Человеческие антитела по изобретению тем не менее могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии иммуноглобулинов человека (например, за счет мутаций, внесенных путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматических мутаций *in vivo*), например, в последовательностях CDR и, в частности, CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не должен включать антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из последовательностей зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности иммуноглобулина человека.

Антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" должен охватывать все человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описанные ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанные ниже), антитела, полученные от животных (например, мыши), являющихся трансгенными по генам человеческих иммуноглобулинов (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим методом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, происходящие из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулинов человека. В конкретных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хотя происходят из и являются родственными для последовательностей зародышевой линии V_H и V_L человека, не могут существовать естественным образом в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в композициях и способах по настоящему изобретению, специфически связывают целевой антиген (например, VEGF, рецептор VEGF, CTLA-4 и т.д.). Термин "специфически связывают" или т.п. означает, что антитело или его антигенсва-

звующий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Методы определения того, связывает ли антитело антиген специфически, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое "специфически связывает" CTLA-4, при использовании в контексте настоящего изобретения включает антитела, которые связывают CTLA-4 или его часть с величиной K_D менее чем примерно 1000 нМ, менее чем примерно 500 нМ, менее чем примерно 300 нМ, менее чем примерно 200 нМ, менее чем примерно 100 нМ, менее чем примерно 90 нМ, менее чем примерно 80 нМ, менее чем примерно 70 нМ, менее чем примерно 60 нМ, менее чем примерно 50 нМ, менее чем примерно 40 нМ, менее чем примерно 30 нМ, менее чем примерно 20 нМ, менее чем примерно 10 нМ, менее чем примерно 5 нМ, менее чем примерно 4 нМ, менее чем примерно 3 нМ, менее чем примерно 2 нМ, менее чем примерно 1 нМ или менее чем примерно 0,5 нМ, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса. Выделенное антитело, которое специфически связывает IL-4R α человека, может, однако, иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы IL-4R α из других видов (отличных от человека).

Антитела, используемые в контексте композиций и способов по настоящему изобретению, могут иметь pH-зависимые характеристики связывания. Например, антитело для использования в композициях и способах по настоящему изобретению может проявлять ослабленное связывание со своим антигеном при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Альтернативно, антитело по изобретению может проявлять усиленное связывание со своим антигеном при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Выражение "кислое значение pH" включает значения pH менее чем примерно 6,2, например примерно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое в настоящем документе выражение "нейтральное значение pH" означает значение pH от примерно 7,0 до примерно 7,4. Выражение "нейтральное значение pH" включает значения pH примерно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях "ослабленное связывание с антигеном при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH" выражают в виде отношения величины K_D связывания антитела со своим антигеном при кислом значении pH к величине K_D связывания антитела со своим антигеном при нейтральном значении pH (или наоборот). Например, для целей настоящего изобретения можно считать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет "ослабленное связывание с CTLA-4 при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH", если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет соотношение K_D кислой/нейтральной среды, составляющее примерно 3,0 или более.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления соотношение K_D кислой/нейтральной среды для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять примерно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания можно получать, например, путем скрининга популяции антител на ослабленное (или усиленное) связывание с конкретным антигеном при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут приводить к получению антител с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в области CDR) на остаток гистидина можно получать антитело с ослабленным связыванием антигена при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Используемый в настоящем документе термин "кислое значение pH" означает значение pH, составляющее 6,0 или менее.

Антитела, используемые в контексте композиций и способов по настоящему изобретению, могут содержать Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела (например, анти-VEGF, антитела против рецептора VEGF, анти-CTLA-4 и т.д.), содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(и) увеличивает аффинность Fc-домен к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где величина pH находится в диапазоне от примерно 5,5 до примерно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке в случае введения животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q), 250 и 428 (например, L или F), 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (напри-

мер, T250Q и M428L), а также модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение включает способы и композиции с использованием антител (например, анти-VEGF, антитела против рецептора VEGF, анти-CTLA-4 и т.д.), содержащих Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеперечисленных мутаций Fc-домена, а также других мутаций в переменных доменах антител, описанных в настоящем документе, входят в объем настоящего изобретения.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что комбинация антагониста VEGF (например, ловушки VEGF) и анти-CTLA-4 IgG2a антитела обеспечивает превосходные противоопухолевые эффекты в системе модели на мышах по сравнению с комбинацией антагониста VEGF (например, ловушки VEGF) и анти-CTLA-4 IgG2b антитела (см., например, пример 4 ниже в настоящем документе). Антителом человека, эквивалентным мышиному антителу IgG2a, которое обеспечивает эффекторную активность ADCC и CDC, является IgG1. Таким образом, настоящее изобретение включает композиции и способы с использованием антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела, при этом анти-CTLA-4 антитело имеет изотип Fc, обеспечивающий эффекторную активность ADCC и CDC, такой как IgG1.

Фармацевтические композиции, содержащие антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело. Фармацевтические композиции в соответствии с данным аспектом изобретения могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Способы совместного формулирования биологических терапевтических средств известны в данной области и могут быть использованы рядовым специалистом в данной области для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель" включает подходящие носители, эксципиенты и другие средства, которые обеспечивают подходящий перенос, доставку, толерантность и т.п. Иллюстративные препараты, полезные в контексте настоящего изобретения, можно найти в сборнике Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Приемлемые препараты включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как липофектин™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбируемые пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также публикацию Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Способы лечения и способы введения.

Настоящее изобретение включает способы ингибирования или ослабления роста опухоли у субъекта. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. Ингибирование и/или ослабление роста опухоли можно оценивать путем измерения размера опухоли у субъекта до и после введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению (например, введения антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела). Уменьшение размера опухоли или уменьшение скорости роста опухоли после введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению по сравнению с размером и/или скоростью роста опухоли до введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению свидетельствует об ингибировании или ослаблении роста опухоли у субъекта. В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению приводят к регрессии опухоли. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения ослабление роста опухоли означает, что скорость роста опухоли после введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению является по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% меньше, чем скорость роста опухоли до введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин "ослабление роста опухоли" также включает уменьшение объема опухоли (например, регрессию опухоли).

Настоящее изобретение также включает способы продления или пролонгации срока выживания субъекта, имеющего опухоль. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. Продление или пролонгация срока выживания субъекта, имеющего опухоль, означает, что субъект после введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению (например, введения антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела) имеет более длительный срок выживания по сравнению с имеющими опухоль субъектами в аналогичной ситуации, которые либо не получали лечения, либо получали общепринятое стандартное лечение против конкретной опухоли. Улучшенный срок выживания означает примерно 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 10 месяцев, 12 месяцев, 14 месяцев, 16 месяцев, 18 месяцев, 20 месяцев, 22 месяца, 24 месяца, 26 месяцев, 28 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 40 месяцев или более длительный срок выживания по сравнению с имеющими опухоль субъектами в аналогичной ситуации, которые либо не получа-

ли лечения, либо получали общепринятое стандартное лечение против конкретной опухоли.

Настоящее изобретение также включает способы индукции противоопухолевого иммунитета у субъекта. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антагониста VEGF и терапевтически эффективного количества анти-CTLA-4 антитела. В конкретных вариантах осуществления данного аспекта изобретения субъект мог иметь опухоль до начала лечения антагонистом VEGF и анти-CTLA-4 антителом и после такого лечения приобретать иммунитет или устойчивость к будущим опухолям. При использовании в настоящем документе выражение "индукция противоопухолевого иммунитета" означает, что субъект является устойчивым или по существу устойчивым к будущим опухолям после получения терапевтической комбинации по настоящему изобретению. Противоопухолевый иммунитет также означает, что у субъекта, который ранее имел опухоль и был успешно вылечен (например, путем введения терапевтической комбинации по настоящему изобретению), не будет развиваться опухоль того же или аналогичного типа в будущем.

В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать введение антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела субъекту в отдельных лекарственных формах. Например, антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело можно вводить субъекту отдельными инъекциями, инфузиями или другими способами доставки лекарственного средства, известными в данной области. При раздельном введении отдельные лекарственные формы (т.е. одну, содержащую антагонист VEGF, и другую, содержащую анти-CTLA-4 антитело) можно вводить субъекту одновременно или последовательно. При одновременном введении оба средства вводят субъекту в течение промежутка времени менее чем примерно 1 мин. При последовательном введении одно средство вводят в первый момент времени и другое средство вводят во второй, более поздний момент времени. Второй момент времени может быть позже на 1, 2, 5, 10, 20, 30 мин, 1 ч или более, чем первый момент времени. В конкретных вариантах осуществления антагонист VEGF вводят первым с последующим введением анти-CTLA-4 антитела. В других вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело вводят первым с последующим введением антагониста VEGF.

В способах по настоящему изобретению антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело можно вводить субъекту в отдельных лекарственных формах с одинаковой частотой введения (например, один раз в неделю, раз в две недели, раз в четыре недели, раз в восемь недель, раз в десять недель, раз в двенадцать недель и т.д.). Альтернативно, два средства можно вводить субъекту в отдельных лекарственных формах с разной частотой введения. Например, антагонист VEGF можно вводить субъекту более часто, чем анти-CTLA-4 антитело; или анти-CTLA-4 антитело можно вводить субъекту более часто, чем антагонист VEGF.

В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать введение антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела субъекту в одной лекарственной форме. Используемый в настоящем документе термин "одна лекарственная форма" означает композицию, содержащую как антагонист VEGF, так и анти-CTLA-4 антитело. В конкретных вариантах осуществления одна лекарственная форма может содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, описанных в другом разделе настоящего документа. Способы совместного формулирования двух или более биологических терапевтических средств в одной лекарственной форме известны в данной области и могут быть использованы, в зависимости от обстоятельств, в контексте данного аспекта изобретения.

Способы и композиции по настоящему изобретению полезны для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в мозге и оболочках, ротоглотке, легких и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских репродуктивных органах, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, а также специальных сенсорных органах, таких как глаз. Конкретные формы рака, которые можно лечить способами и композициями по настоящему изобретению, включают, например, почечноклеточный рак, карциному печени, рак молочной железы, рак предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, колоректальный рак, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, рак яичника, глиобластому и меланому.

В конкретных вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению полезны для лечения устойчивых к анти-VEGF опухолей у субъекта. Используемый в настоящем документе термин "устойчивая к анти-VEGF опухоль" означает опухоль, которая не отвечает или лишь частично отвечает на лечение анти-VEGF средством, таким как анти-VEGF антитело, антитело против рецептора VEGF или любой другой специфически связывающий VEGF белок (включая, например, ловушку VEGF, описанную в настоящем документе). Например, устойчивая к анти-VEGF опухоль может представлять собой, например, опухоль, которая при контакте с некоторым количеством антагониста VEGF, который обычно обладает способностью ингибировать или ослаблять рост по меньшей мере одного типа опухоли, продолжает расти и/или пролиферировать *in vitro* или *in vivo* (например, в культуре клеток или после имплантации животному). Устойчивая к анти-VEGF опухоль может быть опухолью, полученной из клеток опухолей, которые обычно отвечают на анти-VEGF терапию, но вследствие селекции, мутации или

адаптации приобрели устойчивость к одному или более анти-VEGF средствам.

Субъекты, которых можно лечить с использованием способов и композиций по настоящему изобретению, включают любого субъекта с диагностированным раком или который идентифицирован как имеющий опухоль. В конкретных вариантах осуществления субъект является пациентом, который был диагностирован или идентифицирован как имеющий опухоль, которая по меньшей мере частично устойчива к анти-VEGF терапии. Способы диагностирования пациента, как имеющего устойчивую к анти-VEGF опухоль, известны специалистам в данной области и могут быть использованы на практике как способы рутинной диагностики.

Дополнительные терапевтические средства.

Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические препараты, содержащие антагонист VEGF и анти-CTLA-4 антитело в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими активными компонентами, а также способы лечения, включающие введение таких комбинаций субъектам, которые нуждаются в этом.

Дополнительные терапевтически активные компоненты, которые можно комбинировать и/или вводить в сочетании с антагонистом VEGF и анти-CTLA-4 антителом в контексте настоящего изобретения, включают, например, одно или более из следующего: антагонист EGFR (например, анти-EGFR антитело [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2 [например, трастузумаб или T-DM1 {кадцила®}], анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R антитело), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- α (например, анти-PDGFR- α антитело), ингибитор PDGFR- β (например, анти-PDGFR- β антитело или низкомолекулярный ингибитор киназы, такой как, например, иматиниб мезилат или сунитиниб малат), ингибитор лиганда PDGF (например, анти-PDGF-A, -B, -C или -D антитело, аптамер, миРНК и т.д.), низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, раскрытое в US 2009/0142354, такое как REGN421), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, раскрытое в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (например, анти-FOLH1 антитело), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEAP2 антитело), антагонист TMRSS2 (например, анти-TMRSS2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакина (например, антитело против уроплакина [например, анти-UPK3A]), антагонист MUC16 (например, анти-MUC16 антитело), антагонист Tn-антигена (например, анти-Tn антитело), антагонист CLEC12A (например, анти-CLEC12A антитело), антагонист TNFRSF17 (например, анти-TNFRSF17 антитело), антагонист LGR5 (например, анти-LGRS антитело), одновалентный антагонист CD20 (например, одновалентное анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб) и т.д. Другие средства, которые можно с успехом вводить или совместно формулировать в комбинации с антагонистом VEGF и анти-CTLA-4 антителом, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связывают цитокины, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или их соответствующие рецепторы.

Настоящее изобретение включает композиции, терапевтические препараты и способы для лечения с использованием антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела в сочетании с одним или более химиотерапевтическими средствами. Примеры химиотерапевтических средств, полезных в контексте данного аспекта изобретения, включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (цитоксанTM); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоба, карбоквон, метуредоба и уредоба; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднемустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевинны такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, калихеамицин, карабин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, иринотекан, лейковорин и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин,

доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калюстерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средства, компенсирующие недостаток фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиний ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSKTM; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазикивон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; декарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепу; таксаны, например паклитаксел (таксолTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (таксотерTM; Aventis Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые аналоги, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Также включены в это определение антигормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, например, антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

Настоящее изобретение также включает композиции, терапевтические препараты и способы лечения с использованием антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела в сочетании с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиопротекторами, хелаторами металлов, IFN-гамма и/или НПВС.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы), например любое из средств, перечисленных выше, либо их производные или сочетания, можно вводить непосредственно до, одновременно или вскоре после введения антагониста VEGF и/или анти-CTLA-4 антитела, в контексте настоящего изобретения (для целей настоящего изобретения такие схемы введения считают введением антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела "в сочетании с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антагонист VEGF и/или анти-CTLA-4 антитело совместно сформулирован/сформулированы с одним или более из дополнительных терапевтически активных компонентов, описанных в другом разделе настоящего документа.

Доставка лекарственного средства и способы введения.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтических композиций по изобретению, например инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, публикацию Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы введения. Композицию(и) можно вводить любым удобным способом введения, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника, и т.д.), и можно вводить совместно с другими биологически активными средствами.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (содержащую, например, одно терапевтически активное средство либо комбинацию двух или более терапевтически активных средств) можно доставлять подкожно или внутривенно с использованием стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки шприц-ручку легко можно использовать для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такие шприц-ручки могут быть многоразового или одноразового использования. В шприц-ручке многоразового использования, как правило, используют сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция в картридже была введена и картридж опустел, пустой картридж легко отбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого шприц-ручку можно вновь использовать. В шприц-ручке одноразового использования нет сменного картриджа. Вместо этого шприц-ручка одноразового использования бывает предварительно заполнена фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри ручки. После того как в резервуаре не остается фармацевтической композиции, устройство целиком выбрасывают.

В некоторых ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления можно использовать насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы; см. сборник Medical Applications of

Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте осуществления систему контролируемого высвобождения можно помещать вблизи мишени композиции, в этом случае требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, p. 115-138). Другие системы контролируемого высвобождения рассмотрены в обзоре Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты можно изготавливать известными способами. Например, инъекционные препараты можно изготавливать, к примеру, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций можно назвать, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества, и т.д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионный сурфактант [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксидиленовый (50 мол) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в сочетании с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленный таким образом инъекционный препарат предпочтительно заливать в подходящую ампулу.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального использования, описанные выше, изготавливают в лекарственных формах, стандартная доза которых соответствует дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д.

Дозировка.

Количество активного ингредиента(ов) (например, антагониста VEGF и/или анти-CTLA-4 антитела), содержащееся в фармацевтических композициях по настоящему изобретению и/или вводимое субъекту в соответствии со способами по настоящему изобретению, как правило, является терапевтически эффективным количеством. Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" в контексте антагониста VEGF и/или анти-CTLA-4 антитела означает количество терапевтического средства, отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством, которое способно производить измеримый биологический эффект в организме субъекта-человека или животного. Примеры таких измеримых биологических эффектов включают, например, обнаружение терапевтической молекулы в сыворотке субъекта, обнаружение соответствующих метаболитических продуктов в биологическом образце, полученном от субъекта, изменение концентрации соответствующего биомаркера в образце, полученном от субъекта, уменьшение размера опухоли, уменьшение скорости роста опухоли, регрессию опухоли, более продолжительный срок выживания субъекта и/или улучшение любого другого соответствующего терапевтического или клинического параметра.

В случае антагониста VEGF (например, ловушки VEGF) или анти-CTLA-4 антитела терапевтически эффективное количество может составлять от примерно 0,05 до примерно 600 мг, например, примерно 0,05 мг, примерно 0,1 мг, примерно 1,0 мг, примерно 1,5 мг, примерно 2,0 мг, примерно 10 мг, примерно 20 мг, примерно 30 мг, примерно 40 мг, примерно 50 мг, примерно 60 мг, примерно 70 мг, примерно 80 мг, примерно 90 мг, примерно 100 мг, примерно 110 мг, примерно 120 мг, примерно 130 мг, примерно 140 мг, примерно 150 мг, примерно 160 мг, примерно 170 мг, примерно 180 мг, примерно 190 мг, примерно 200 мг, примерно 210 мг, примерно 220 мг, примерно 230 мг, примерно 240 мг, примерно 250 мг, примерно 260 мг, примерно 270 мг, примерно 280 мг, примерно 290 мг, примерно 300 мг, примерно 310 мг, примерно 320 мг, примерно 330 мг, примерно 340 мг, примерно 350 мг, примерно 360 мг, примерно 370 мг, примерно 380 мг, примерно 390 мг, примерно 400 мг, примерно 410 мг, примерно 420 мг, примерно 430 мг, примерно 440 мг, примерно 450 мг, примерно 460 мг, примерно 470 мг, примерно 480 мг, примерно 490 мг, примерно 500 мг, примерно 510 мг, примерно 520 мг, примерно 530 мг, примерно 540 мг, примерно 550 мг, примерно 560 мг, примерно 570 мг, примерно 580 мг, примерно 590 мг или примерно 600 мг антагониста VEGF или анти-CTLA-4 антитела.

Количество антагониста VEGF (например, ловушки VEGF) и/или анти-CTLA-4 антитела, введенное субъекту, можно выражать в размерности миллиграммов антитела на 1 кг массы тела субъекта (т.е. мг/кг). Например, антагонист VEGF (например, ловушку VEGF) и/или анти-CTLA-4 антитело можно вводить пациенту в дозе от примерно 0,0001 до примерно 10 мг/кг массы тела субъекта.

Примеры

Следующие далее примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и использовать способы и композиции по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и от-

клонения. Если не указано иначе, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура указана в градусах по Цельсию и давление является атмосферным или примерно атмосферным.

Пример 1. Противоопухолевые эффекты комбинации анти-CTLA-4 антитела и антагониста VEGF в мышинной модели раннего лечения опухоли.

Модель раннего лечения опухоли была разработана для проверки эффективности комбинации анти-CTLA-4 антитела и антагониста VEGF. В данной модели комбинированные препараты вводили вскоре после имплантации опухоли. Анти-CTLA-4 антитело, используемое в данном эксперименте, представляло собой IgG2b антитело клона "9D9" против CTLA-4 мыши (Bio X Cell, West Lebanon, NH, Cat. No. BE0164). Антагонист VEGF, используемый в данном эксперименте, представлял собой афлиберцепт (химерную молекулу на основе рецептора VEGF, также известную как "ловушка VEGF" или "VEGFR1R2-FcΔC1 (a)", полное описание которой приведено в другом разделе настоящего документа).

Для данной экспериментальной модели $1,0 \times 10^6$ клеток опухоли Colon-26 имплантировали мышам в день 0. Начиная со дня 3 до образования измеримых опухолей мыши получали лечение одним из вариантов моно- или комбинированной терапии, либо контрольной комбинацией, как указано в табл. 1.

Таблица 1

Группа лечения	Первое средство	Второе средство
Контрольная комбинация	IgG2b изотипический контроль (100 мкг, в/б)	чФс контроль (10 мг/кг, п/к)
Только ловушка VEGF	IgG2b изотипический контроль (100 мкг, в/б)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)
Только анти-CTLA-4	анти-CTLA-4 МАТ 9D9 (100 мкг, в/б)	чФс контроль (10 мг/кг, п/к)
Ловушка VEGF + анти-CTLA-4	анти-CTLA-4 МАТ 9D9 (100 мкг, в/б)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)

Различные терапевтические препараты вводили в пять разных моментов времени на протяжении двухнедельного периода (т.е. инъекции в день 3, день 7, день 10, день 14 и день 18).

Животных в каждой группе лечения оценивали с точки зрения частоты возникновения опухолей, объема опухолей, среднего срока выживания и количества животных, не имеющих опухолей, в день 50 (т.е. в течение 50 дней). Данные относительно степени развития опухолей в обобщенном виде приведены на фиг. 1 (кривые роста опухолей) и фиг. 2 (объем опухолей в день 22), и процент выживаемости с течением времени приведен на фиг. 3.

Результаты также суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Группа лечения	Средний срок выживания	Частота образования опухолей в день 17	Количество животных без опухолей ко дню 50
Контрольная комбинация	24 дня	9/10	1/10
Только ловушка VEGF	35 дней	8/10	0/10
Только анти-CTLA-4	42 дня	7/10	3/10
Ловушка VEGF + анти-CTLA-4	>50 дней (70%)	3/10	7/10

Рост опухолей был значительно снижен у животных, получавших комбинацию "ловушка VEGF + анти-CTLA-4 антитело", по сравнению с группами лечения одним средством (см. фиг. 1 и 2). Более того, срок выживания значительно увеличивался в группе "ловушка VEGF + анти-CTLA-4 антитело", при этом 70% животных выживали по меньшей мере до дня 50 после имплантации опухолей. Напротив, в группах монотерапии анти-CTLA-4 и ловушкой VEGF выживаемость до дня 50 составляла только 30 и 0% соответственно (см. фиг. 3 и табл. 2).

Таким образом, данный пример демонстрирует, что комбинация анти-CTLA-4 антитела и антагониста VEGF при введении в ранний момент развития опухоли способна ингибировать рост опухоли и

улучшать показатель выживаемости в гораздо большей степени, чем любое терапевтическое средство в отдельности.

Пример 2. Противоопухолевый иммунитет у животных, ранее получавших лечение комбинацией анти-CTLA-4 антитела и антагониста VEGF, в мышинной модели раннего лечения опухоли.

В качестве продолжения примера 1 выбирали животных, не имеющих опухолей, из разных групп лечения (см. табл. 1 и 2) и повторно имплантировали им $1,0 \times 10^6$ клеток опухоли Colon-26 в день 60 после первоначальной имплантации опухолей. В данный эксперимент также включали в качестве контролей не подвергавшихся воздействию животных, к которым не применяли имплантацию опухоли или лечение. Различные группы лечения для этого дополнительного эксперимента приведены в табл. 3.

Таблица 3

Группа лечения	Количество животных без опухолей после первоначальной имплантации
Контрольная комбинация (IgG + чFc)	1
Только ловушка VEGF	0
Только анти-CTLA-4	3
Ловушка VEGF + анти-CTLA-4	6
Не подвергавшаяся воздействию группа А	10
Не подвергавшаяся воздействию группа В	10

Животным из каждой группы лечения имплантировали 1×10^6 клеток опухоли Colon-26 в день 60 после первоначальной имплантации клеток опухоли (см. пример 1). Объем опухолей и выживаемость оценивали через 14 и 32 дней после повторной имплантации опухолей. Результаты приведены на фиг. 4А и 4В. Как можно видеть, у животных из групп "только анти-CTLA-4" и "ловушка VEGF + анти-CTLA-4" опухоли не развивались на протяжении всего эксперимента (т.е. до дня 32), в то время как у нативных животных, которые не получали никакого предварительного терапевтического воздействия, опухоли развивались, как и ожидалось. Все три животных в группе "только анти-CTLA-4" выжили после повторной имплантации опухоли, и 5 из 6 животных в группе "ловушка VEGF + анти-CTLA-4" выжили после повторной имплантации опухоли до конца эксперимента (день 32).

Этот пример демонстрирует, что лечение анти-CTLA-4 антителом в отдельности или в комбинации с антагонистом VEGF индуцирует ответ иммунологической памяти, который защищает получавших лечение субъектов от будущего развития опухолей.

Пример 3. Противоопухолевые эффекты комбинации анти-CTLA-4 антитела и антагониста VEGF в мышинной модели позднего лечения опухоли.

В примере 1 мышей подвергали терапевтическому воздействию вскоре после имплантации опухолей. В данном примере, напротив, лечение было намеренно отложено до того, как опухоли были сформированы. Эксперимент проводили следующим образом: в день 0 мышам имплантировали 1×10^6 клеток опухоли Colon-26. В день 11, после того как опухоли вырастали примерно до 60 мм^3 , мышей рандомизировали в группы с одинаковыми средними размерами опухолей и лечили одним из вариантов моно- или комбинированной терапии либо контрольной комбинацией, как в примере 1 (см. табл. 1). Различные терапевтические препараты вводили в пять разных моментов времени на протяжении двухнедельного периода (т.е. инъекции в день 11, день 15, день 17, день 21 и день 25).

Животных в каждой группе лечения оценивали с точки зрения частоты возникновения опухолей, объема опухолей, среднего срока выживания и количества животных, не имеющих опухолей, вплоть до дня 70. Данные относительно степени развития опухолей в обобщенном виде приведены на фиг. 5 (кривые роста опухолей) и фиг. 6 (объем опухолей в день 70), и данные по проценту выживаемости приведены на фиг. 7. Результаты также суммированы в табл. 4.

Таблица 4

Группа лечения	Средний срок выживания	Количество животных без опухолей ко дню 70
Контрольная комбинация	31 день	0/7
Только ловушка VEGF	49 дней	2/15
Только анти-CTLA-4	>70 дней	7/15
Ловушка VEGF + анти-CTLA-4	>70 дней	7/15

В модели позднего лечения противоопухолевые ответы наблюдали в группе монотерапии анти-CTLA-4, а также в группе комбинированной терапии ловушкой VEGF + анти-CTLA-4. Кроме того, более длительный срок выживания имел место в группе монотерапии анти-CTLA-4, а также в группе комбинированной терапии ловушкой VEGF + анти-CTLA-4, со средним процентом выживаемости 86 и 80% соответственно, ко дню 70.

Аналогичный эксперимент проводили для оценки эффекта комбинации "ловушка VEGF Trap + анти-CTLA-4", а также разных средств в отдельности и контрольных комбинаций на рост опухолей и гистопатологические характеристики отдельных опухолей в модели опухоли Colon-26. Вкратце, 40 взрослым самцам мышей Balb/c (возраст 7-8 недель) имплантировали клетки опухоли Colon-26 в день 0 (1×10^6 клеток опухоли Colon-26 на мыш, инъектированных в правый бок). Опухолям давали возможность расти до примерного объема 60-80 мм³ (до дня 7). В день 7 после имплантации мышей делили на группы и лечили одним из вариантов моно- или комбинированной терапии либо контрольной комбинацией, как в примере 1 (см. табл. 1). Различные терапевтические препараты вводили мышам в пять разных моментов времени (т.е. инъекции в день 7, день 11, день 14, день 17 и день 20). Объем опухолей измеряли на протяжении всего периода лечения. В день 21 после имплантации 5 опухолей собирали от мышей в каждой группе лечения для гистопатологического исследования. Опухоли вырезали вместе с прилегающим кожным лоскутом и фиксировали путем погружения в свежеприготовленный и pH-сбалансированный 10% раствор формалина на 24 ч, затем промывали 70% этанолом и хранили в 70% этаноле при комнатной температуре. Делали срезы залитых парафином опухолей и окрашивали специальными гистологическими красителями H&E и трихромом по Массону. Данные по объемам опухолей приведены на фиг. 8 и 9; данные по регрессии и некрозу опухолей в день 21 приведены на фиг. 10 и 11 соответственно.

Результаты этого второго эксперимента подтвердили, что каждый из анти-CTLA-4 или ловушки VEGF подавлял скорость роста сформировавшихся опухолей Colon-26 при использовании в качестве отдельного средства и что комбинированная терапия (ловушка VEGF + анти-CTLA-4) приводила к еще большему снижению роста опухолей в данной модели. В данной модели также было отмечено, что терапия анти-CTLA-4 антителом приводит к большей плотности инфильтрирующих опухоль CD8⁺ Т-клеток, но не CD4⁺ Т-клеток.

Гистопатологическое исследование опухолей в этом эксперименте показало, что регрессии опухоли способствует лечение как анти-CTLA-4, так и ловушкой VEGF; однако механизмы, с помощью которых каждое из средств стимулировало регрессию опухоли, судя по всему, различались. В частности, лечение ловушкой VEGF стимулировало увеличение некроза опухоли, в то время как лечение только анти-CTLA-4 не стимулировало четкого увеличения некроза опухолей (фиг. 11). Лечение комбинацией "ловушка VEGF + анти-CTLA-4" приводило к увеличению некроза опухолей в значительно большей степени, чем это наблюдалось в группе лечения только ловушкой VEGF (фиг. 11).

Гистопатологическое исследование также показало, что лечение анти-CTLA-4 (отдельно или в сочетании) приводило к увеличению опухолевых/околоопухолевых инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоцитов и макрофагов. Возросший некроз, инфильтраты воспалительных клеток и фиброз опухолей вносили вклад в регрессию опухолей во всех группах лечения, но были особенно заметны в группах лечения анти-CTLA-4 (фиг. 12A-12C).

Результаты данного примера подтверждают, что лечение анти-CTLA-4 является эффективной стратегией лечения для сформировавшихся опухолей и что сходные терапевтические результаты достигаются при использовании комбинации антагониста VEGF и анти-CTLA-4 антитела.

Пример 4. Влияние константной области (Fc) иммуноглобулина на противоопухолевый эффект анти-CTLA-4 антител и повышенный противоопухолевый эффект ловушки VEGF в сочетании с анти-CTLA-4 антителом с сильной эффекторной функцией (IgG2a).

В предыдущих примерах, приведенных выше, в экспериментах использовали анти-CTLA-4 антитело изотипа IgG2b (т.е. коммерчески доступное IgG2b антитело клона "9D9" против CTLA-4 мыш). Известно, что IgG2b антитела обладают слабыми эффекторными функциями, в то время как IgG2a антитела обладают сильными эффекторными функциями. Соответственно, в данном примере изучали роль кон-

стантной области иммуноглобулина анти-CTLA-4 антитела. В частности, противоопухолевые эффекты мышинных вариантов IgG2a и IgG2b мышиноного анти-CTLA-4 антитела сравнивали в мышинных моделях позднего лечения ксенотрансплантатов опухолей Colon-26 и MC38.

В первом эксперименте мышам BalbC имплантировали клетки опухоли Colon-26 подкожно в количестве 1×10^6 клеток на мышь. В день 10 после имплантации мышей рандомизировали по объему опухолей ($60-80 \text{ мм}^3$) в 5 групп. Различные группы лечения приведены в табл. 5.

Таблица 5

Описание групп лечения
Без лечения - 8 мышей
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2a в дозе 100 мкг/мышь, в/б инъекция - 15 мышей
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2b (9D9) в дозе 100 мкг/мышь, в/б инъекция - 15 мышей
Изотипический контроль mIgG2a в дозе 100 мкг/мышь, в/б инъекция - 8 мышей
Изотипический контроль mIgG2b в дозе 100 мкг/мышь, в/б инъекция - 8 мышей

Мыши получали в дни 12, 15, 19, 22, 26, 30, 33, 37 и 41 (т.е. два раза в неделю на протяжении эксперимента) 100 мкг анти-CTLA-4 антитела или контрольного антитела путем внутрибрюшинной инъекции (в/б), как указано в табл. 5. Объем опухолей и выживаемость определяли два раза в неделю. Результаты показаны на фиг. 13 (объем опухолей) и фиг. 14 (выживаемость). Средние сроки выживания приведены в табл. 6.

Таблица 6

Группа лечения	Средний срок выживания (дни)
Без лечения	37
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2a	>70
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2b (9D9)	70
Изотипический контроль mIgG2a	35
Изотипический контроль mIgG2b	39

Во втором эксперименте мышам C57/BL6 имплантировали клетки опухоли MC38 подкожно в количестве 3×10^6 клеток на мышь. После имплантации, когда опухоли достигали среднего размера $40-50 \text{ мм}^3$, мышей рандомизировали в 5 разных групп. Различные группы лечения приведены в табл. 7.

Таблица 7

Описание групп лечения
Без лечения - 7 мышей
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2a в дозе 200 мкг/мышь, в/б инъекция - 14 мышей
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2b (9D9) в дозе 200 мкг/мышь, в/б инъекция - 14 мышей
Изотипический контроль mIgG2a в дозе 200 мкг/мышь, в/б инъекция - 7 мышей
Изотипический контроль mIgG2b в дозе 200 мкг/мышь, в/б инъекция - 7 мышей

Мыши получали в дни 10, 14, 17, 21 и 24 (т.е. пять инъекций в течение 2 недель) 200 мкг анти-CTLA-4 антитела или контрольного антитела путем внутрибрюшинной инъекции (в/б), как указано в табл. 7. Объем опухолей и выживаемость определяли два раза в неделю. Результаты показаны на фиг. 15 (объем опухолей с течением времени), фиг. 16 (объем опухолей в день 21) и 17 (выживаемость). Средние сроки выживания приведены в табл. 8.

Таблица 8

Группа лечения	Средний срок выживания (дни)
Без лечения	24
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2a	>31
Анти-CTLA-4 изотипа mIgG2b (9D9)	24
Изотипический контроль mIgG2a	24
Изотипический контроль mIgG2b	24

Результаты этих экспериментов показали, что анти-CTLA-4 IgG2a антитело было гораздо более эффективным, чем вариант IgG2b, что приводило к ликвидации сформировавшихся опухолей Colon-26 и частичному ингибированию роста сформировавшихся опухолей MC38. Напротив, эти сформировавшиеся опухоли были устойчивы к лечению с помощью IgG2b.

В третьем эксперименте противоопухолевый эффект комбинации анти-CTLA-4 mIgG2a антитела и ловушки VEGF изучали *in vivo*. В данном эксперименте мышам имплантировали клетки опухолей MC38 подкожно в количестве 3×10^5 клеток на мышь в день 0. После имплантации, когда опухоли достигали среднего размера 60-80 мм³ (в день 14), мышей рандомизировали в 4 разные группы. Различные группы лечения приведены в табл. 9.

Таблица 9

Группа лечения	Первое средство	Второе средство
Контрольная комбинация	Изотипический контроль IgG2a (200 мкг, в/б)	Контроль чФс (10 мг/кг, п/к)
Только ловушка VEGF	Изотипический контроль IgG2a (200 мкг, в/б)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)
Только анти-CTLA-4	Анти-CTLA-4 IgG2a мАт (200 мкг, в/б)	Контроль чФс (10 мг/кг, п/к)
Ловушка VEGF + анти-CTLA-4	Анти-CTLA-4 IgG2a мАт (200 мкг, в/б)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)

Мыши получали контрольный препарат и экспериментальные комбинации в дни 15, 17, 23, 25, 27, 33, 35 и 37 путем внутривенной инъекции (в/б), как указано в табл. 9. Объемы опухолей определяли два раза в неделю. Результаты показаны на фиг. 18 (объем опухолей с течением времени) и фиг. 19 (объем опухолей в день 24).

В четвертом эксперименте противоопухолевый эффект комбинации анти-CTLA-4 mIgG2b антитела и ловушки VEGF изучали *in vivo*. В данном эксперименте мышам имплантировали клетки опухоли MC38 подкожно в количестве 3×10^5 клеток на мышь в день 0. После имплантации, когда опухоли достигали среднего размера 60-80 мм³ (в день 10), мышей рандомизировали в 4 разные группы. Различные группы лечения приведены в табл. 10.

Таблица 10

Группа лечения	Первое средство	Второе средство
Контрольная комбинация	Изотипический контроль IgG2b (200 мкг, в/б)	Контроль чФс (10 мг/кг, п/к)
Только ловушка VEGF	Изотипический контроль IgG2b (200 мкг, в/б)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)
Только анти-CTLA-4	Анти-CTLA-4 IgG2b мАт (200 мкг, в/б)	Контроль чФс (10 мг/кг, п/к)
Ловушка VEGF + анти-CTLA-4	Анти-CTLA-4 IgG2b мАт (200 мкг, в/б)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)

Мыши получали контрольный препарат и экспериментальные комбинации в дни 10, 14, 18, 21 и 25 путем внутривенной инъекции (в/б), как указано в табл. 10. Объемы опухолей определяли два раза в неделю. Результаты показаны на фиг. 20 (объем опухолей с течением времени) и фиг. 21 (объем опухолей в день 18).

Важно отметить, что, как показали результаты третьего и четвертого экспериментов, приведенные выше, анти-CTLA-4 IgG2a антитело и ловушка VEGF (афлиберцепт) оказывали сильный комбинаторный

эффект на сформировавшиеся опухоли MC38, в то время как анти-CTLA-4 IgG2b антитело не потенцировало эффективность ловушки VEGF. Эти результаты дополнительно свидетельствуют о том, что комбинирование иммунотерапии (например, лечение анти-CTLA-4) и антагонизма VEGF может быть полезным для лечения сформировавшихся опухолей в клинических условиях.

Пример 5. Количественная оценка инфильтрации Т-клеток, активированного иммунитета и неоваскуляризации у мышей, получавших лечение комбинацией анти-CTLA-4 антитела и ловушки VEGF.

В данном примере эффекты комбинированной терапии ловушкой VEGF и анти-CTLA-4 антителом на рост опухолей и другие количественные параметры, связанные с генной экспрессией и инфильтрацией опухолей, изучали на модели сформировавшейся подкожной опухоли мышины карциномы MC38.

Сингенным мышам C57/Bl6 в возрасте 8-10 недель имплантировали в правый бок 100 мкл суспензии 3×10^5 клеток MC38 в день 0. В день 9 мышей со сформировавшимися опухолями рандомизировали в группы (n=8 мышей/группу) со средним объемом опухолей 50 мм³ и вводили четыре вида препаратов: анти-CTLA-4 антитело (анти-CTLA-4 мыши, клон 9D9 изотипа mIgG2a), ловушку VEGF (VEGFR1R2-FcΔC1 (a)), комбинацию анти-CTLA-4 антитела и ловушки VEGF или изотипические контроли в дни 9, 13, 16 и 20. Ловушку VEGF и контроль hFc вводили подкожно в дозе 10 мг/кг, а анти-CTLA-4 антитело и изотипический контроль mIgG2a вводили в/б в количестве 200 мкг на мышью.

Объем опухолей (объем в мм³) измеряли с помощью электронного штангенциркуля в разные моменты времени на протяжении эксперимента.

В день 21 мышей умерщвляли и опухоли извлекали для анализа мРНК определенных генов методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (Taqman®). Суммарную РНК выделяли из тканей с использованием набора для выделения суммарной РНК MagMAX™-96 for Microarrays Total RNA Isolation Kit (Ambion by Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Геномную ДНК выделяли с использованием буфера MagMAX™Turbo™DNase Buffer и TURBO DNase из набора MagMAX, указанного выше (Ambion by Life Technologies). Проводили обратную транскрипцию мРНК в кДНК с использованием Superscript® VILO™ Master Mix (Invitrogen by Life Technologies). кДНК разбавляли до концентрации 5 нг/мкл и 25 нг кДНК амплифицировали с помощью TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies), используя систему Sequence Detection System (Applied Biosystems). Ген циклофилина В (Ppib) использовали в качестве внутреннего эндогенного контрольного гена для нормирования любых различий во внесенной ДНК. Меченный красителем FAM зонд Taqman MGB (Life Technologies) использовали для мышинового CD247 (Mm00446171_m1), м-IFN γ (Mm01168134_m1), м-TNF α (Mm00443260_g1), м-Dll4 (Mm01338015_m1), м-Ang2 (Mm00545822_m1), м-Robo4 (Mm00452963_m1), м-Itgam (Mm00434455_m1), м-Emr1 (Mm00802529_m1), м-Itgax (Mm00498701_m1), Е-селектина (Mm01310197_m1). Меченный красителем FAM зонд BHQ (Biosearch Technologies) использовали для мышинового CD8b. Условия термальных циклов ПЦР были следующими: начальная стадия при 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов при 95°C в течение 3 с и 60°C в течение 30 с. Отношение для количества мРНК каждого гена рассчитывали следующим образом: (абсолютное число копий каждого гена)/(абсолютное число копий циклофилина В).

Результаты выражали в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка и обычный однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Тьюки использовали для оценки статистической значимости. Значение менее 0,05 считали статистически значимым. *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005; ****P<0,0001.

In vivo лечение сформировавшихся опухолей MC38 либо анти-CTLA-4 антителом, либо ловушкой VEGF приводило к значительному ингибированию роста опухолей по сравнению с контролем (фиг. 22, заштрихованные квадраты ■ и незаштрихованные кружки ○ соответственно). Блокирование с помощью обоих средств приводило к дополнительному уменьшению роста опухоли MC38, демонстрируя комбинированный противоопухолевый эффект (фиг. 22, заштрихованные треугольники ▲).

Анализ методом ПЦР в реальном времени опухолевой РНК показал, что антиангиогенное средство ловушка VEGF вызывает снижение экспрессии ангиогенных маркерных генов Dll4, Ang2 и Robo4, в то время как лечение с помощью анти-CTLA-4 не влияет на эти гены (фиг. 23, 24 и 25 соответственно). Комбинация ловушки VEGF с анти-CTLA-4 Ат вызывает существенное возрастание уровня Е-селектина (фиг. 26), свидетельствуя об активации эндотелиальных клеток, что отражает улучшенную способность лимфоцитов мигрировать к опухолям.

Анализ методом ПЦР в реальном времени также использовали для оценки экспрессии инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, чтобы оценить противоопухолевые иммунные ответы. При том что ловушка VEGF не влияла на рекрутинг Т-лимфоцитов, лечение с помощью анти-CTLA-4 Ат приводило к значительному увеличению числа CD8⁺ и CD3⁺ Т-клеток (CD247), которое еще больше возрастало в группе комбинированного лечения (фиг. 27 и 28). Лечение с помощью анти-CTLA-4 Ат, но не ловушки VEGF, также приводило к возрастанию экспрессии Treg-клеточного маркера FoxP3 (forkhead box protein 3) (не показано).

Иммунную среду опухоли дополнительно анализировали, оценивая экспрессию воспалительных цитокинов. Анти-CTLA-4 антитело и комбинированный терапевтический препарат приводили к значи-

тельному увеличению уровней интерферона (IFN γ) и фактора некроза опухолей (TNF α), в то время как монотерапия ловушкой VEGF не имела ни одного из данных эффектов (фиг. 29 и 30 соответственно).

Для анализа инфильтратов миелоидных клеток оценивали уровни мРНК Itgam (CD11b), Emr1 (F4/80) и Itgax (CD11c) в качестве маркеров миелоидных клеток, макрофагов и дендритных клеток соответственно. Анти-CTLA-4 антитело и комбинированный терапевтический препарат стимулировали значительное увеличение инфильтратов миелоидных клеток (фиг. 31-33) с наиболее заметным возрастанием инфильтрации в опухоли дендритных клеток в группе комбинированной терапии.

В итоге данный пример дополнительно демонстрирует значительный эффект комбинации анти-CTLA-4 антитела и ловушки VEGF, направленный против сформировавшихся опухолей.

Молекулярное иммунное профилирование подвергнутых лечению опухолей свидетельствовало о том, что терапевтические средства анти-CTLA-4 и ловушка VEGF опосредуют их эффекты путем регулирования иммуномодулирующих и ангиогенных сигнальных путей соответственно, оба из которых могут вносить вклад в усиленные противоопухолевые иммунные ответы в группе комбинированной терапии. При введении ловушки VEGF наблюдали активированный эндотелий и снижение экспрессии ангиогенных факторов Dll4, Ang2 и Robo4. Повышенная экспрессия Е-селектина в группе комбинированной терапии может указывать на лучшую адгезию и роллинг лимфоцитов, что может приводить к усиленной инфильтрации лимфоцитов в опухолевые ткани. Этот результат согласуется с повышенным количеством Т-клеток и миелоидных клеток, а также повышенной экспрессией воспалительных цитокинов, что наблюдали в подвергнутых лечению анти-CTLA-4 опухолях, и дополнительным возрастанием показателей в группе комбинированной терапии, что свидетельствует о синергическом характере противоопухолевого иммунного ответа на двойную блокаду VEGF и CTLA-4.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области из приведенного выше описания и сопроводительных фигур. Такие модификации должны входить в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для ингибирования или ослабления роста опухоли у субъекта, содержащая:

(i) терапевтически эффективное количество антагониста VEGF, где антагонист VEGF содержит ловушку, содержащую Ig-подобный домен 2 из VEGFR1, Ig-подобный домен 3 из VEGFR2 и мультимеризующий домен;

(ii) терапевтически эффективное количество анти-CTLA-4 антитело;

(iii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что ловушка VEGF содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) компонент мультимеризации, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что ловушка VEGF содержит VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a), кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой антагонистическое антитело.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипелимумаб или тремелимумаб.

6. Способ ингибирования или ослабления роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.1-5, где антагонист VEGF содержит ловушку VEGF, содержащую Ig-подобный домен 2 из VEGFR1, Ig-подобный домен 3 из VEGFR2 и мультимеризующий домен.

7. Способ по п.6, где композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что ловушка VEGF содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) компонент мультимеризации, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что ловушка VEGF содержит VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a), кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

10. Способ по любому из пп.6-9, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой антагонистическое антитело.

11. Способ по любому из пп.6-9, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипелимумаб или тремелимумаб.

12. Способ продления или пролонгации срока выживания субъекта, имеющего опухоль, включаю-

щий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.1-5, где антагонист VEGF содержит ловушку VEGF, содержащую Ig-подобный домен 2 из VEGFR1, Ig-подобный домен 3 из VEGFR2 и мультимеризующий домен.

13. Способ по п.12, где композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что ловушка VEGF содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) компонент мультимеризации, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что ловушка VEGF содержит VEGFR1R2-FcΔC1 (a), кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

16. Способ по любому из пп.12-15, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой антагонистическое антитело.

17. Способ по любому из пп.12-15, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб или тремелиумаб.

18. Способ индукции противоопухолевого иммунитета у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из п.п.1-5, где антагонист VEGF содержит ловушку VEGF, содержащую Ig-подобный домен 2 из VEGFR1, Ig-подобный домен 3 из VEGFR2 и мультимеризующий домен.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что субъект имеет опухоль до введения композиции субъекту.

20. Способ по п.18 или 19, отличающийся тем, что композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

21. Способ по п.18, отличающийся тем, что ловушка VEGF содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) компонент мультимеризации, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2.

22. Способ по п.18, отличающийся тем, что ловушка VEGF содержит VEGFR1R2-FcΔC1 (a), кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

23. Способ по любому из пп.18-22, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой антагонистическое антитело.

24. Способ по любому из пп.18-22, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб или тремелиумаб.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что анти-CTLA-4 антитело имеет изотип Fc, который обеспечивает ADCC и CDC эффекторную активность.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, отличающаяся тем, что анти-CTLA-4 антитело имеет изотип IgG1.

27. Способ по любому из пп.6-10, 12-16 или 18-23, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело имеет изотип Fc, который обеспечивает ADCC и CDC эффекторную активность.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что анти-CTLA-4 антитело имеет изотип IgG1.

29. Фармацевтическая композиция для ингибирования или ослабления роста опухоли у субъекта, содержащая:

(i) терапевтически эффективное количество антагониста VEGF, где антагонист VEGF содержит ловушку VEGF, содержащую Ig-подобный домен 2 из VEGFR1, Ig-подобный домен 3 из VEGFR2 и мультимеризующий домен;

(ii) терапевтически эффективное количество анти-CTLA-4 антитела, где анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб или тремелиумаб; и

(iii) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

30. Фармацевтическая композиция по п.29, отличающаяся тем, что ловушка VEGF содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) компонент мультимеризации, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2.

31. Фармацевтическая композиция по п.30, отличающаяся тем, что ловушка VEGF содержит VEGFR1R2-FcΔC1 (a), кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

32. Способ ингибирования или ослабления роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.29-31.

33. Способ по п.32, отличающийся тем, что композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

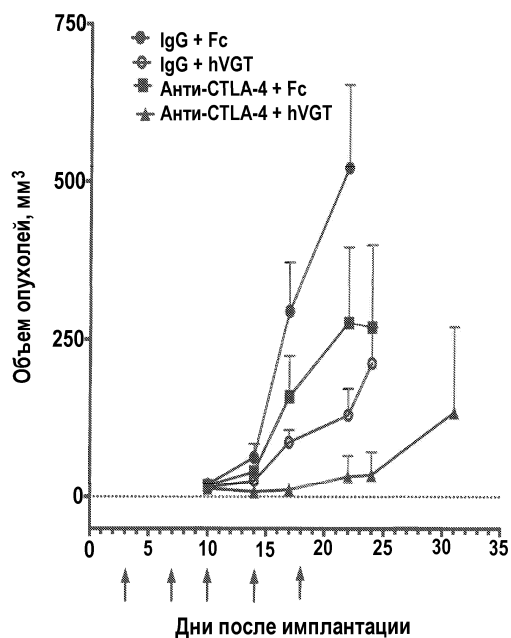
34. Способ продления или пролонгации срока выживания субъекта, имеющего опухоль, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.29-31.

35. Способ по п.34, отличающийся тем, что композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

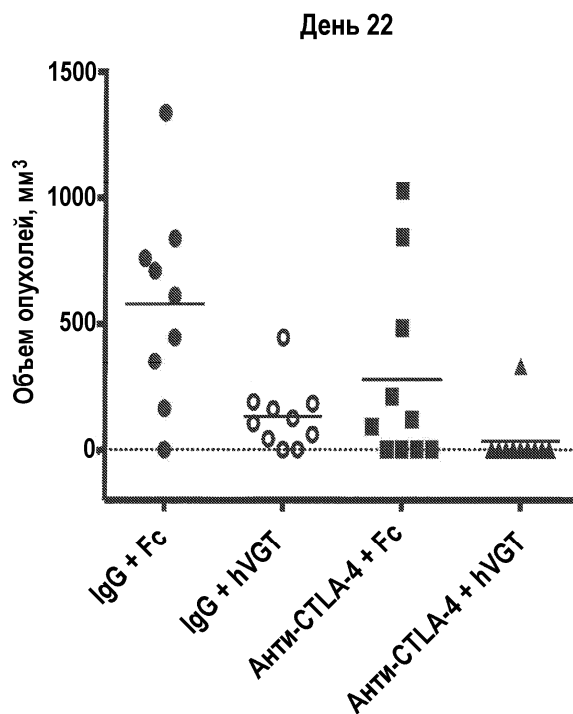
36. Способ индукции противоопухолевого иммунитета у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.29-31.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что субъект имеет опухоль до введения композиции субъекту.

38. Способ по п.36 или 37, отличающийся тем, что композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

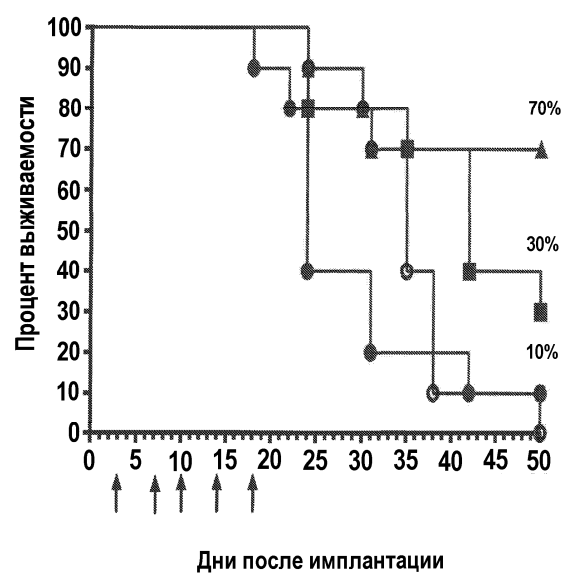


Фиг. 1



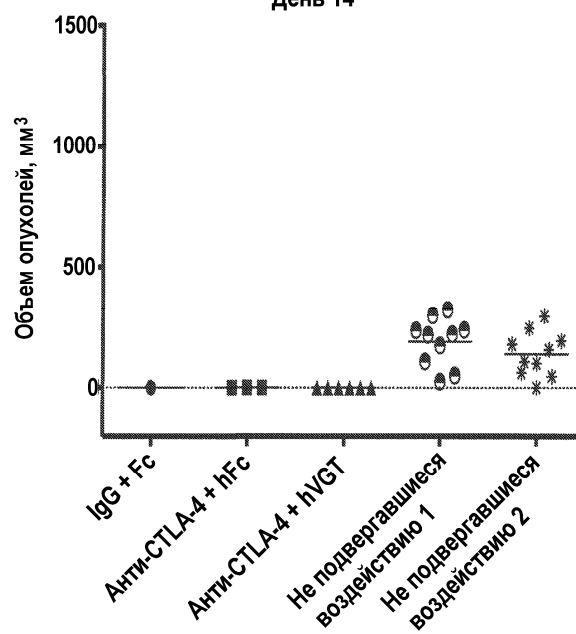
Фиг. 2

● IgG + Fc ◐ IgG + hVGT ■ Анти-CTLA-4 + Fc ▲ Анти-CTLA-4 + hVGT

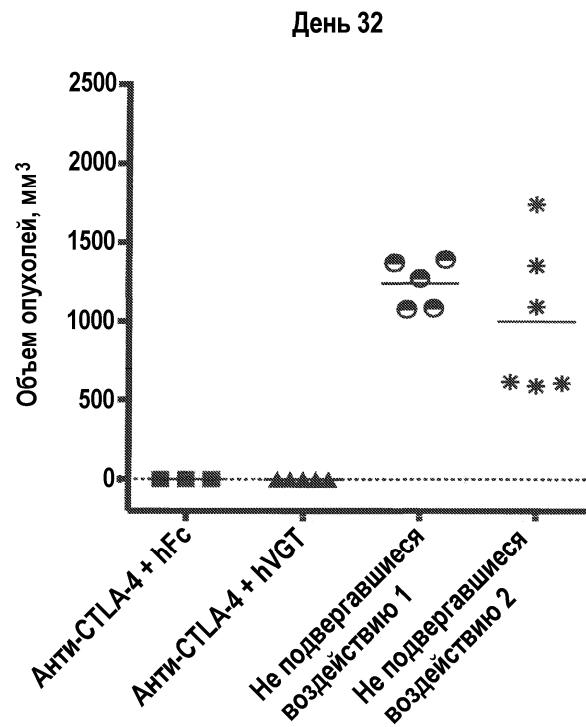


Фиг. 3

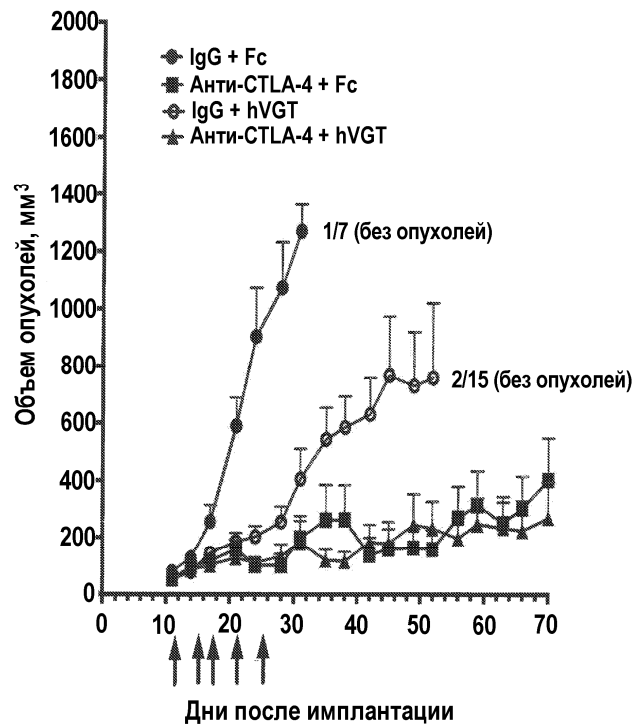
День 14



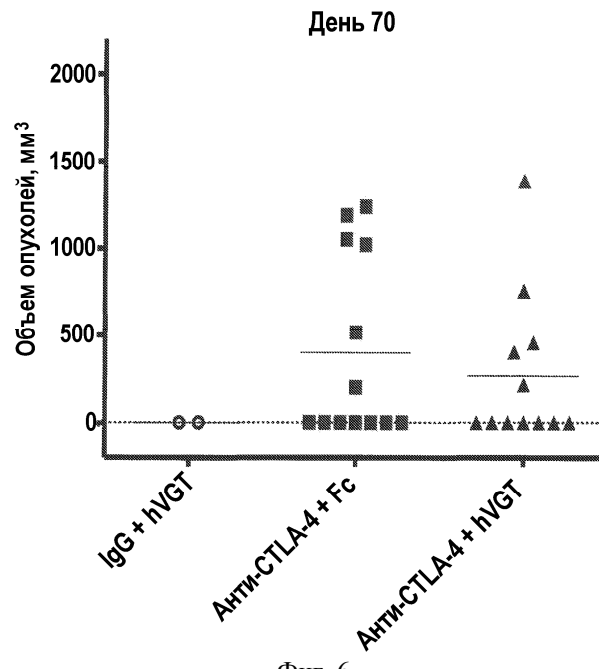
Фиг. 4А



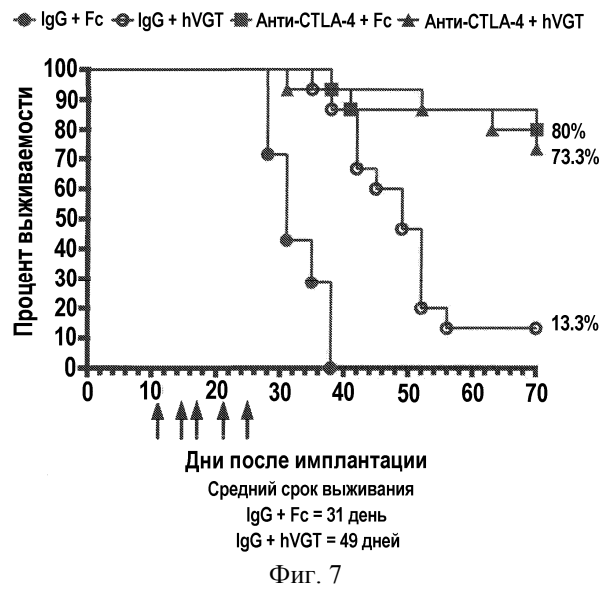
Фиг. 4В



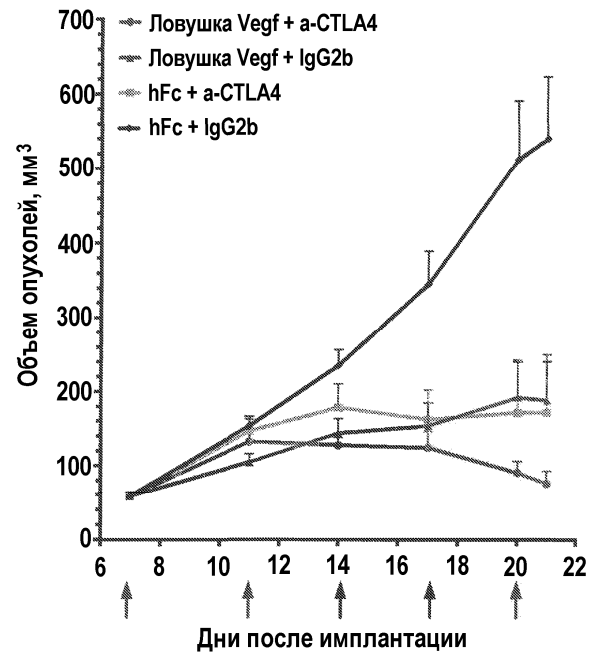
Фиг. 5



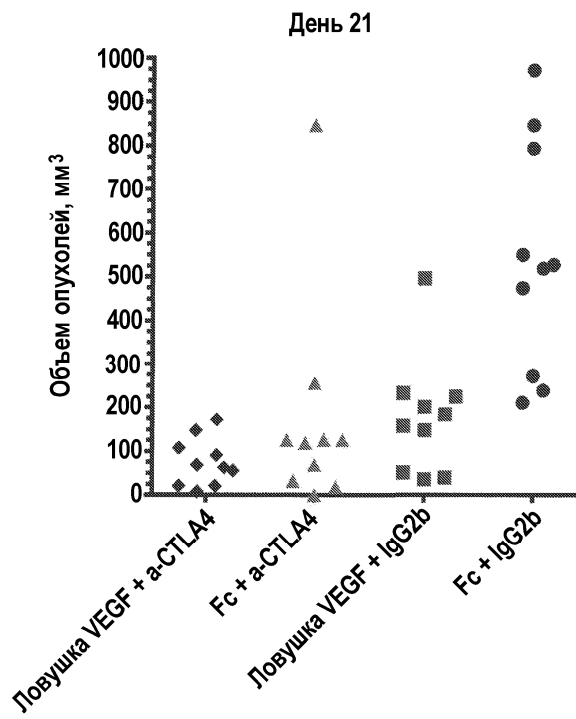
Фиг. 6



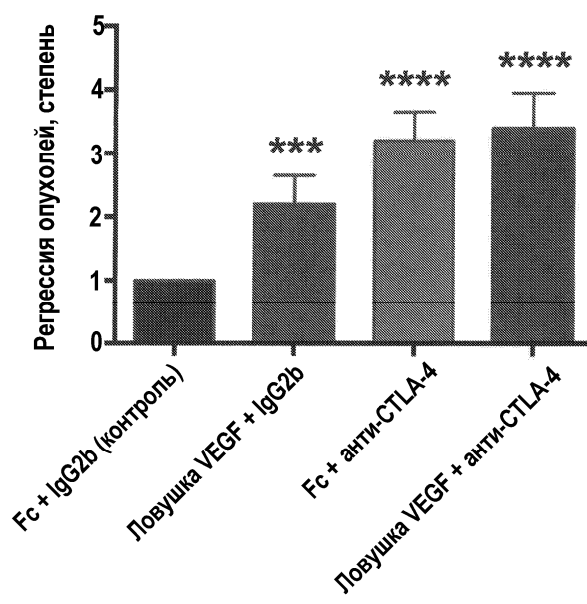
Фиг. 7



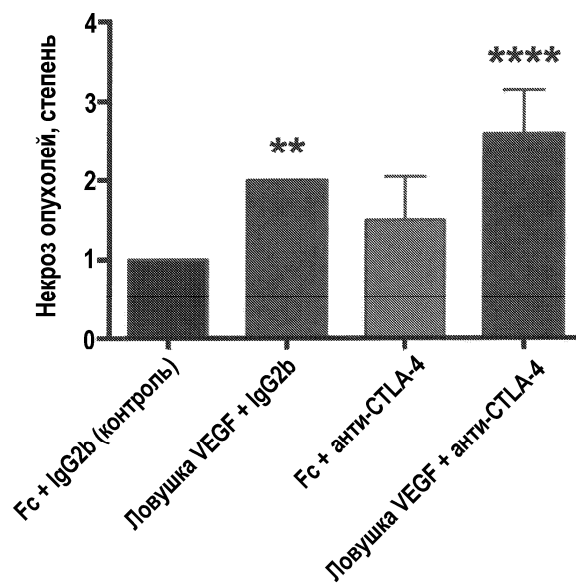
Фиг. 8



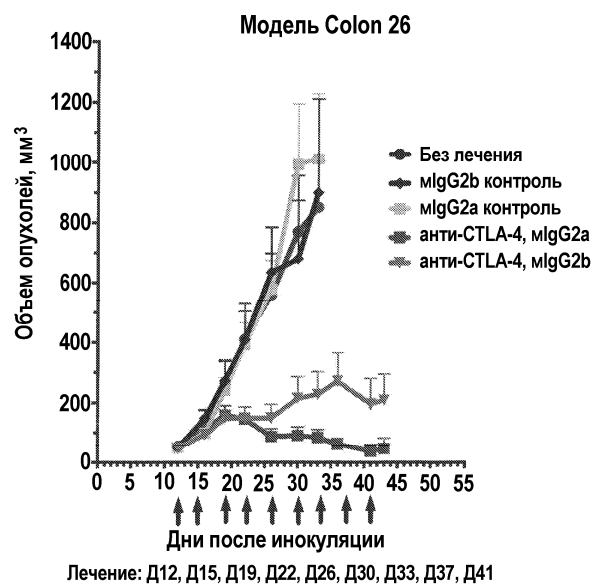
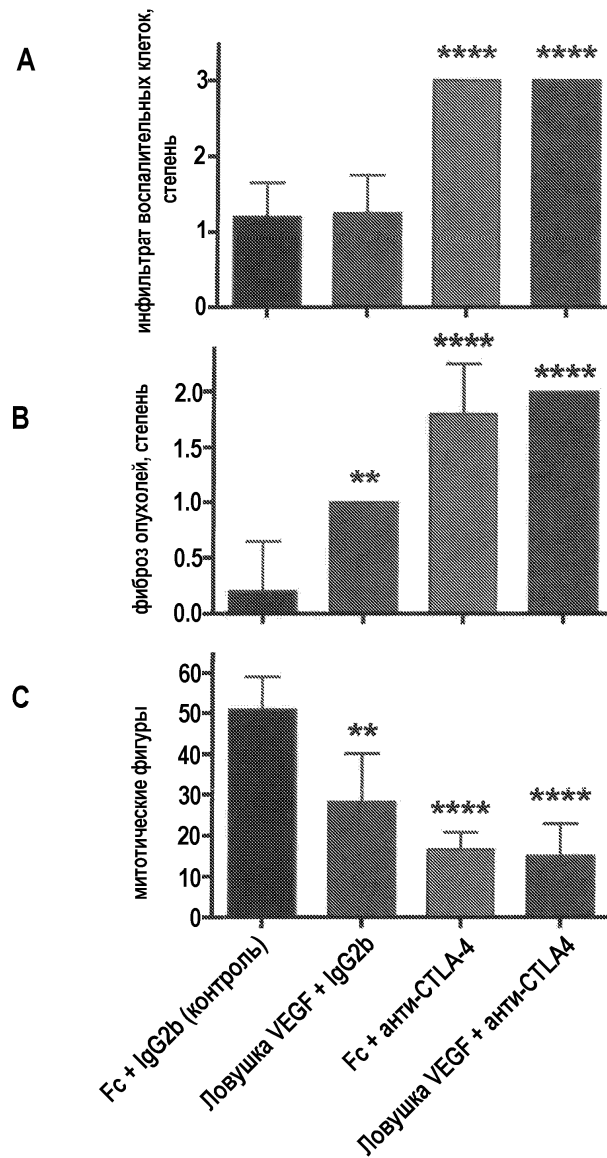
Фиг. 9

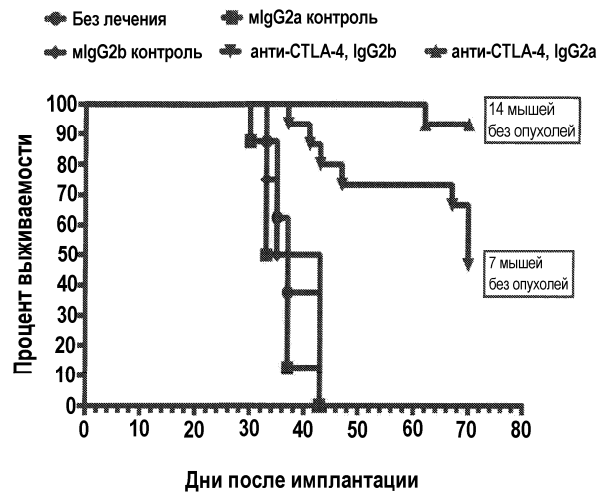


Фиг. 10

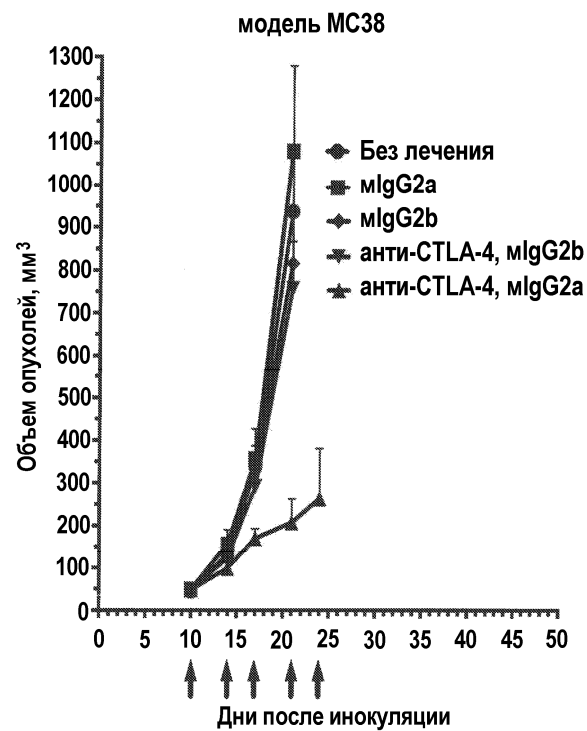


Фиг. 11

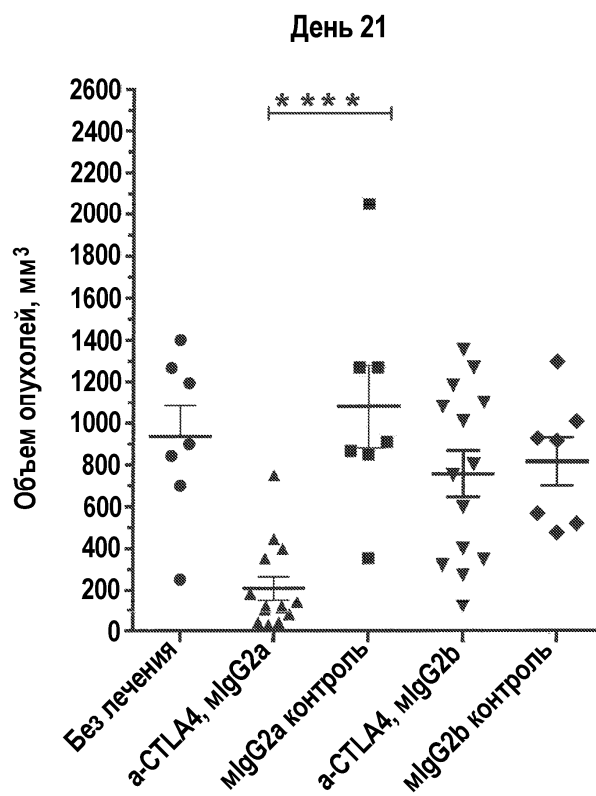




Фиг. 14

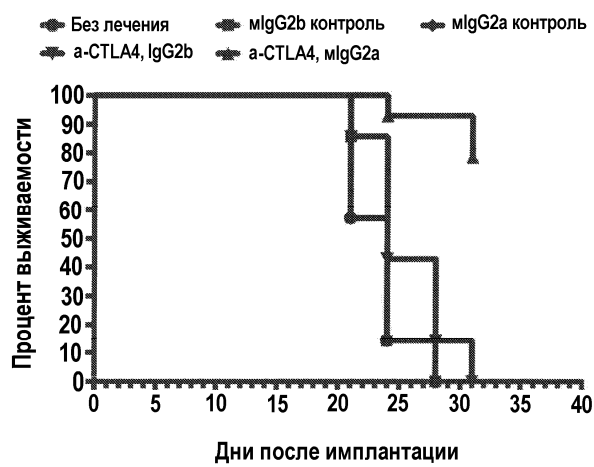


Фиг. 15

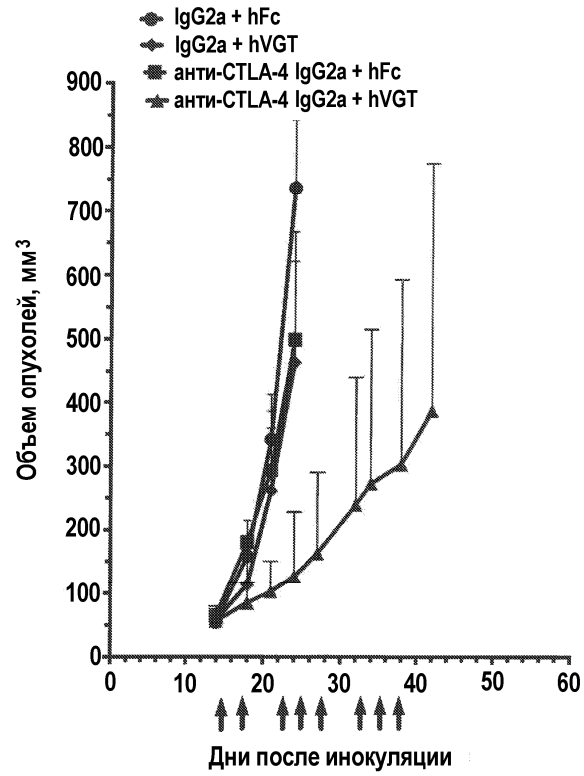


Фиг. 16

Кривые выживаемости

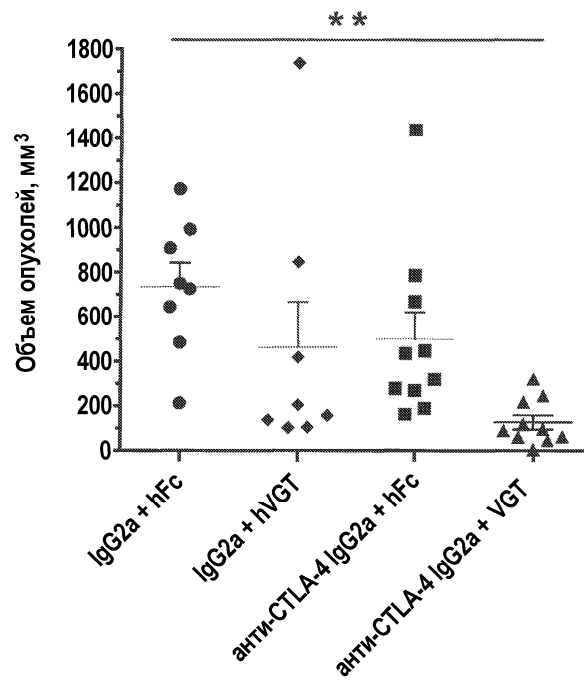


Фиг. 17

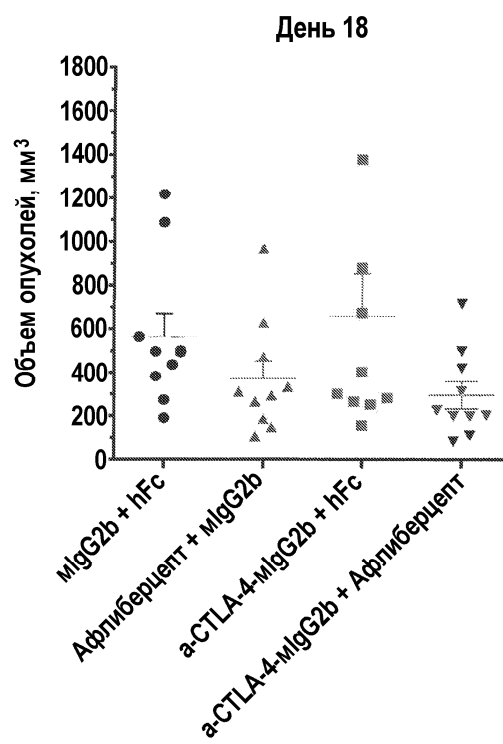
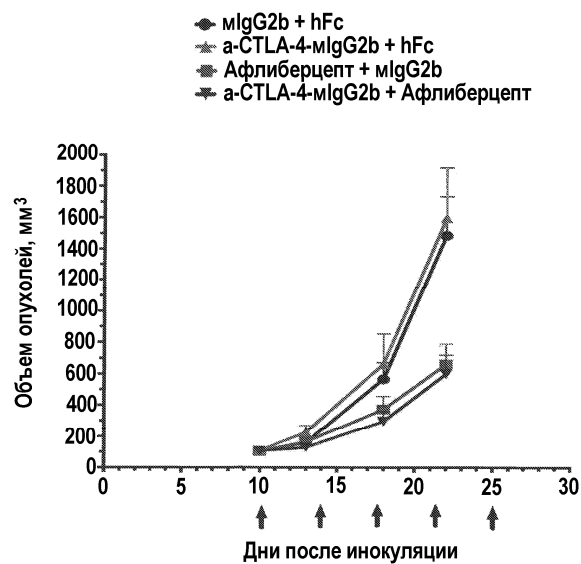


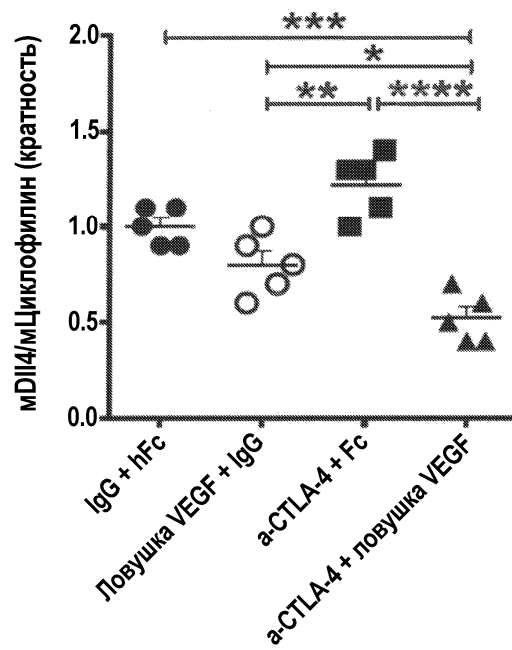
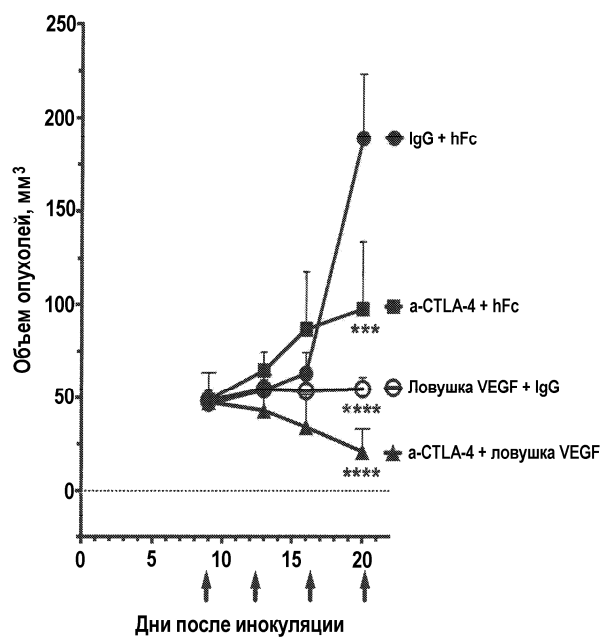
Фиг. 18

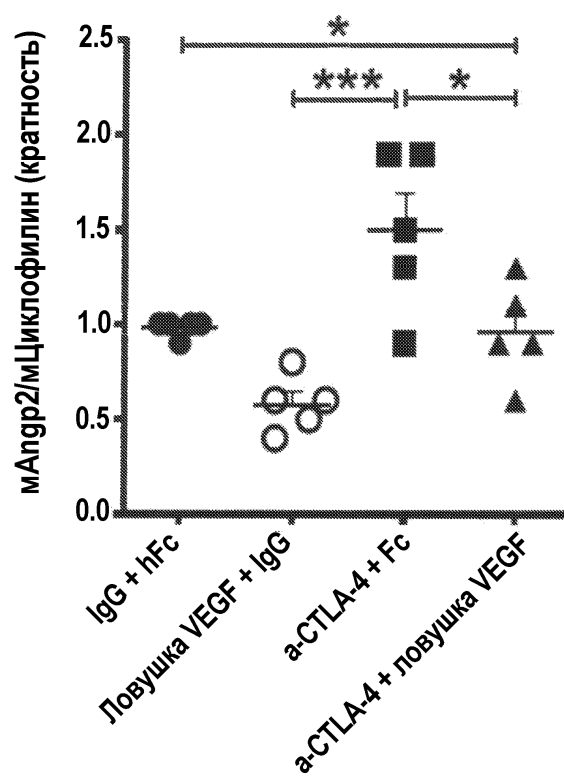
День 24



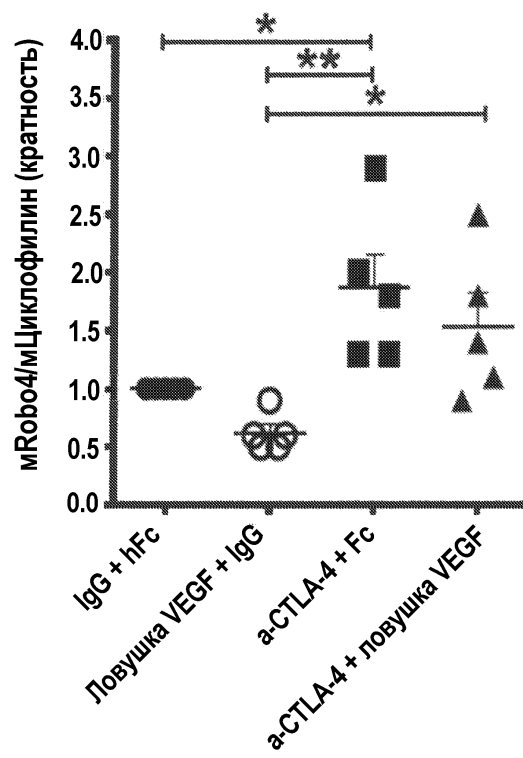
Фиг. 19



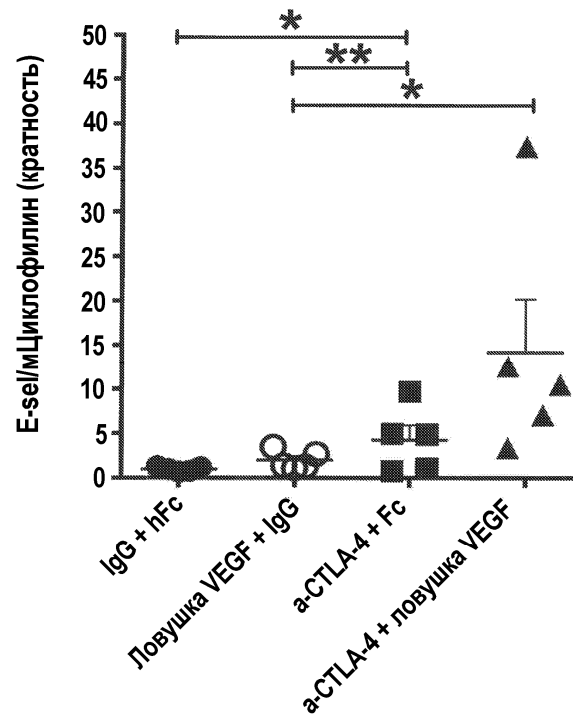




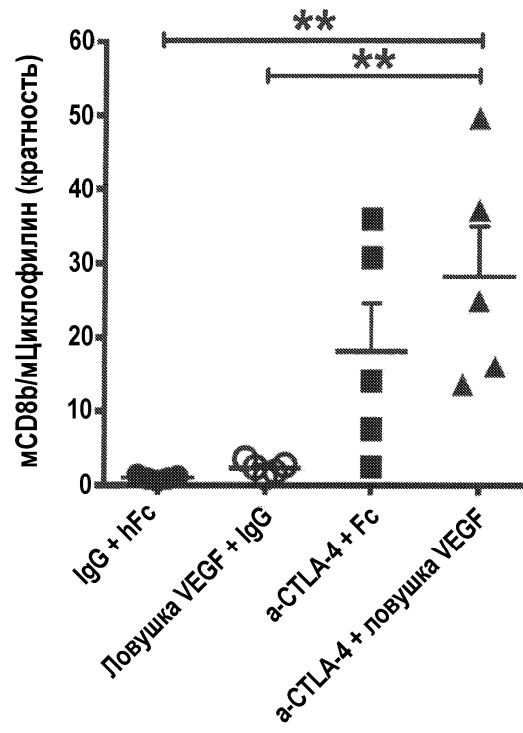
Фиг. 24



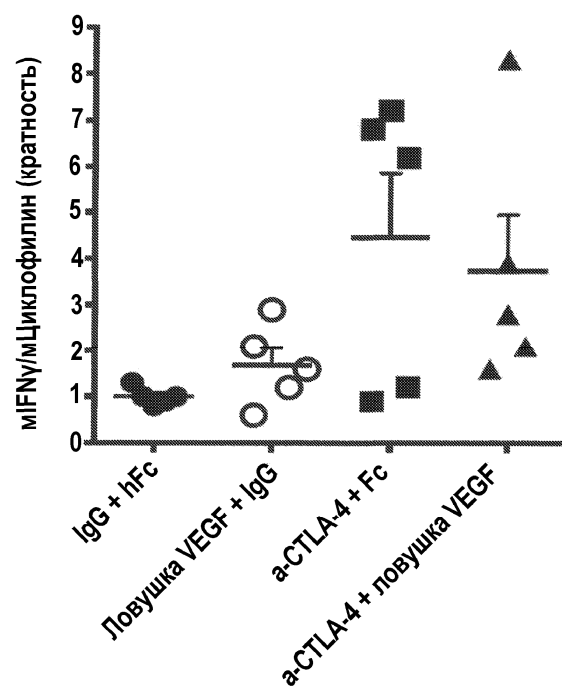
Фиг. 25

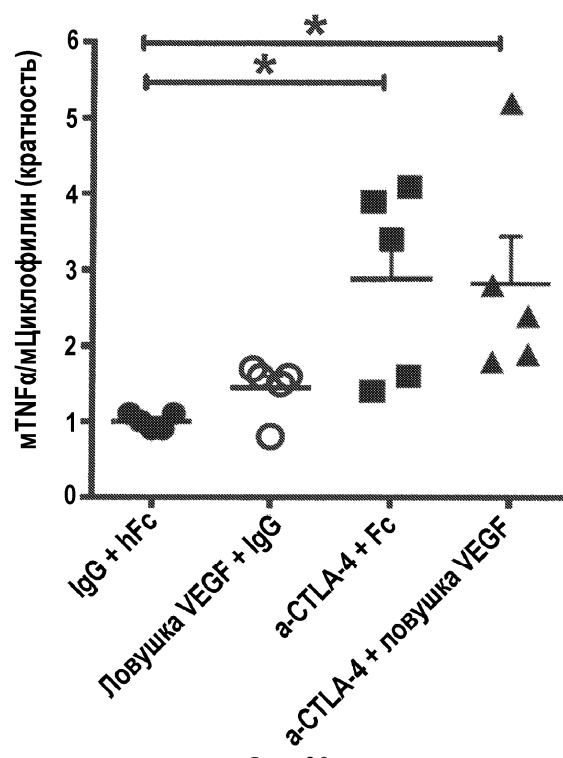


Фиг. 26

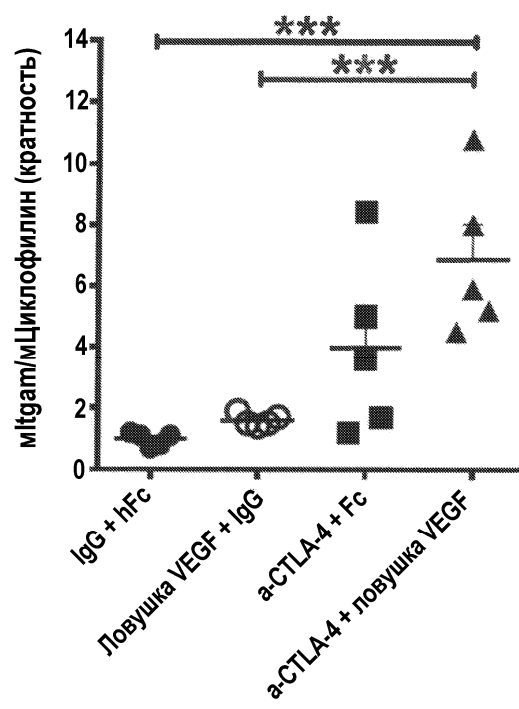


ФИГ. 27

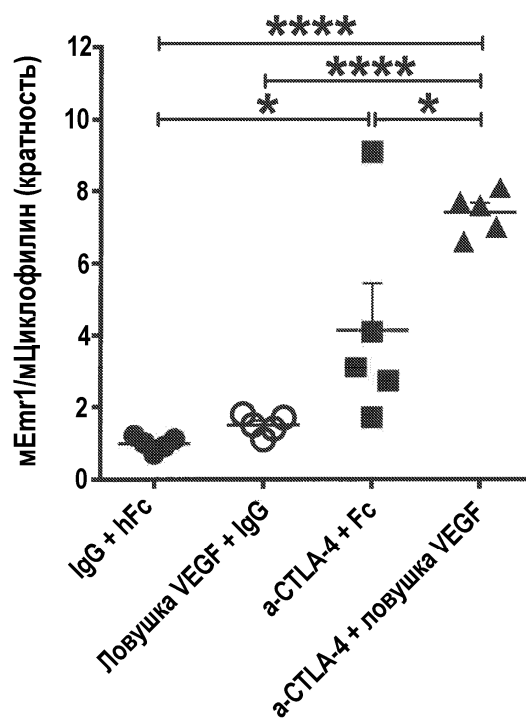




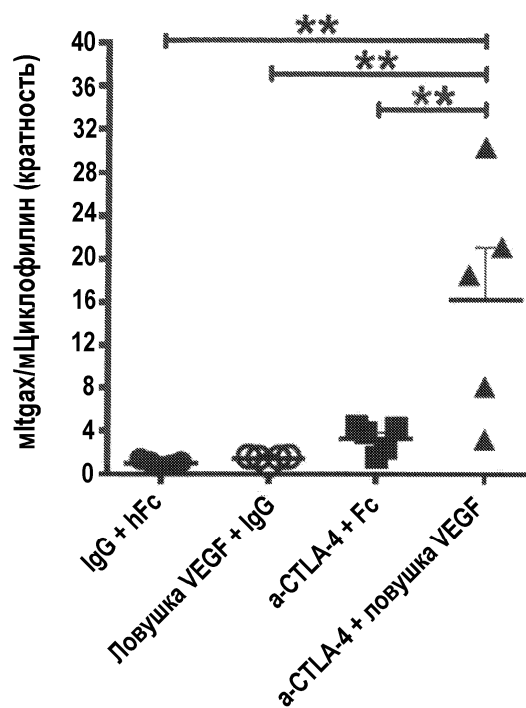
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2