

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190071** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.04.01

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

(22) Дата подачи заявки
2019.06.18

(54) **АНТИТЕЛА К PD-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/687,673; 62/756,319**

(32) **2018.06.20; 2018.11.06**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/037750**

(87) **WO 2019/246110 2019.12.26**

(71) Заявитель:
**ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН;
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Корнфелд Марк, Пандя Наимиш
Бхарат, Уиггинтон Джон Марк, Ла
Могте-Мос Росс, Самроу Брэдли
Джеймс (US)**

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

(57) Описаны способы лечения злокачественного новообразования антителами и фрагментами антител, которые связываются с PD-1.

202190071
A1

202190071

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566471EA/061

АНТИТЕЛА К PD-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/687673, поданной 20 июня 2018 г. и предварительной заявке на патент США № 62/756319, поданной 6 ноября 2018 г. Содержание предыдущих заявок полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Некоторые пациенты со злокачественным новообразованием, включая рак эндометрия, карциному из клеток Меркеля и рак анального канала, имеют плохой долгосрочный прогноз. Для этих злокачественных новообразований необходимы дополнительные и новые способы лечения, особенно для тех пациентов, у которых развивается метастатическое заболевание.

Сущность изобретения

В одном аспекте описание относится к способу лечения рака эндометрия (например, метастатического рака эндометрия) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах осуществления рак эндометрия представляет собой рак эндометрия с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) (например, метастатический рак эндометрия с MSI-H).

В некоторых вариантах осуществления рак эндометрия представляет собой рак

эндометрия с дефицитом коррекции неспаренных оснований (dMMR) (например, метастатический рак эндометрия с dMMR).

В некоторых вариантах осуществления рак эндометрия представляет собой положительный по мутации в экзонуклеазном домене ДНК-полимеразы ϵ (POLE) рак эндометрия (например, положительный по мутации в экзонуклеазном домене POLE метастатической рак эндометрия).

В другом аспекте описание относится к способу лечения карциномы из клеток Меркеля (например, метастатической карциномы из клеток Меркеля) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

В другом аспекте описание относится к способу лечения рака анального канала (например, метастатического рака анального канала) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3

VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах осуществления рак анального канала представляет собой плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC) (например, метастатическую SCAC).

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе около 1 мг/кг один раз в 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе около 3 мг/кг один раз в 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе около 3 мг/кг один раз в 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе около 10 мг/кг один раз в 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе около 10 мг/кг один раз в 4 недели.

В другом аспекте описание относится к способу лечения злокачественного новообразования у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективной фиксированной дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность

RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах осуществления таких способов лечения злокачественного новообразования, включающих введение терапевтически эффективной фиксированной дозы, причем злокачественное новообразование представляет собой рак анального канала, рак мочевого пузыря, рак груди, колоректальный рак, рак эндометрия, гепатоцеллюлярную карциному, глиому, рак почки, рак легкого, карциному из клеток Меркеля, множественную миелому, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки или саркому.

В некоторых вариантах осуществления таких способов лечения злокачественного новообразования, включающих введение терапевтически эффективной фиксированной дозы, причем злокачественное новообразование представляет собой рак эндометрия (например, недифференцированный рак эндометрия, рак эндометрия с высокой MSI, рак эндометрия с dMMR или положительный по мутации в экзонуклеазном домене POLE рак эндометрия), саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого (HMPЛ) или рак шейки матки.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в фиксированной дозе около 375 мг один раз в 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в фиксированной дозе около 500 мг один раз в 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в фиксированной дозе около 750 мг один раз в 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов домен VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов домен VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов домен

VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, а домен VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело представляет собой гуманизованное антитело.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scF_v, sc(F_v)₂ или диатело.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое, как правило, подразумевается средним специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описываются в данном документе, могут применяться на практике или при испытании настоящего изобретения, иллюстративные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае противоречия настоящая заявка, включающая определения, будет иметь преимущественную силу. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описанные в данном документе антитела к PD-1 могут применяться для лечения рака эндометрия, карциномы из клеток Меркеля и рака анального канала.

PD-1

Белок запрограммированной клеточной гибели-1 (PD-1, также известный как CD279) представляет собой мембранный белок типа I размером приблизительно 31 кДа, член расширенного семейства CD28/CTLA-4 регуляторов T-клеток, который в широком смысле негативно регулирует иммунные ответы (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death " EMBO J. 11:3887-3895; публикация патентной заявки США № 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; патенты США №№ 6808710; 7101550; 7488802; 7635757; 7722868; публикация PCT № WO 01/14557).

PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC " *J. Immunol.* 169:5538-5545) и на низких уровнях в натуральных киллерных (NK) Т-клетках (Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice " *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti- Tumor Immunity " *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

Внеклеточная область PD-1 состоит из одного домена иммуноглобулина (Ig)V с 23% идентичностью эквивалентному домену в CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity " *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). За внеклеточным доменом IgV следует трансмембранная область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два сайта фосфорилирования, расположенные в иммунорецепторном тирозиновом ингибирующем мотиве и иммунорецепторном тирозиновом мотиве переключения, что предполагает, что PD-1 негативно регулирует сигналы TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer," *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745).

PD-1 опосредует подавление иммунной системы путем связывания с B7-H1 и B7-DC (Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity " *J. Immunother.* 30(3):251-260; патенты США № 6803192; 7794710; публикации патентных заявок США № 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; публикации PCT № WO 01/39722; WO 02/086083).

Аминокислотная последовательность белка PD-1 человека (номер доступа в Genbank NP_005009) представляет собой:
 MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN
 TSEFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
 DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVG
 LLGSLVLLVWVLA VICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTP
 EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1).

Антитела к PD-1

Это описание включает последовательности моноклонального антитела, антитела X, гуманизированного моноклонального антитела IgG4, которое связывается с PD-1 человека. См. мкАт 7(1.2) к hPD-1 в WO2017019846 и US 2019/0127467, содержание которых включено посредством ссылки. Аминокислотные последовательности зрелых тяжелой и легкой цепей антитела X показаны ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена

легкой цепи (VL) показаны в таком порядке от N- до C-конца зрелых последовательностей VL и VH и подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Антитело, состоящее из зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO: 3), приведенных ниже, обозначают антителом X.

Зрелая тяжелая цепь (HC) антитела X

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**SYWMN**WVRQAPGQGLEWIG**VIH**
PSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE**EHYGTSPFAYW**
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO:2)

Зрелая легкая цепь (LC) антитела X

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASESVDNYGMSFMNWF**QQKPGQPPKLLIHA
ASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYFC**QQSKEVPY**TFGGGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Вариабельный домен тяжелой цепи (VH) антитела X имеет следующую аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**SYWMN**WVRQAPGQGLEWIG**VIH**
PSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE**EHYGTSPFAYW**
 GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)

Вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела X имеет следующую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASESVDNYGMSFMNWF**QQKPGQPPKLLIHA
ASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYFC**QQSKEVPY**TFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO:5)

Аминокислотные последовательности CDR VH антитела X перечислены ниже:

- CDR1 VH: SYWMN (SEQ ID NO:6);
- CDR2 VH: VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO:7);
- CDR3 VH: EHYGTSPFAY (SEQ ID NO:8)

Аминокислотные последовательности CDR VL антитела X перечислены ниже:

- CDR1 VL: RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO:9);
- CDR2 VL: AASNQGS (SEQ ID NO:10); и
- CDR3 VL: QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11).

В определенных вариантах осуществления антитела к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи и легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен

СН2. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен СН3. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домены СН1, СН2 и СН3. Если константная область тяжелой цепи содержит замены, то такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или более из: связывания Fc-рецептора, гликозилирования антитела, числа остатков цистеина, функции эффекторных клеток или функции комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Антитела, например, антитело X, могут быть созданы, например, путем получения и экспрессирования синтетических генов, которые кодируют указанные аминокислотные последовательности, или путем мутирования генов зародышевой линии человека для получения гена, который кодирует указанные аминокислотные последовательности. Более того, это антитело и другие антитела к PD-1 можно получить, например, с использованием одного или более из следующих способов.

Гуманизированные антитела могут быть получены путем замены последовательностей вариабельной области Fv, которые непосредственно не участвуют в связывании антигена, на эквивалентные последовательности из вариабельных областей Fv человека. Общие способы создания гуманизированных антител предоставлены в Morrison, S. L., *Science*, 229:1202-1207 (1985), Oi et al., *BioTechniques*, 4:214 (1986), и в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; и US 6407213. Данные способы включают выделение, манипулирование и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть вариабельных областей Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Источники такой нуклеиновой кислоты хорошо известны специалистам в данной области техники и, например, могут быть получены из гибридомы, продуцирующей антитело против заранее определенной мишени, как описано выше, из генов иммуноглобулина зародышевой линии или из синтетических конструкций. Рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, можно затем клонировать в соответствующий вектор экспрессии.

Последовательности зародышевой линии человека, например, описаны в Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today*, 16: 237-242 (1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.* 227:799-817 (1992); и Tomlinson et al., *EMBO J.*, 14:4628-4638 (1995). Каталог V BASE предоставляет полный каталог последовательностей вариабельной области иммуноглобулина человека (составлен Tomlinson, I.A. et al. Центр исследований белков MRC, Кембридж, Великобритания). Такие последовательности могут быть использованы в качестве источника последовательности человека, например, для каркасных областей и CDR. Также могут быть использованы консенсусные каркасные области человека, например, как описано в патенте США № 6300064.

Также можно использовать другие способы гуманизации антител. Например,

другие способы могут учитывать трехмерную структуру антитела, положения каркаса, которые находятся в трехмерной близости к детерминантам связывания, и иммуногенные пептидные последовательности. См., например, WO 90/07861; патенты США №№ 5693762; 5693761; 5585089; 5530101; и 6407213; Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9:266-271. Еще один способ называется как «гуманиринг» и описан, например, в US 2005-008625.

Антитело может содержать Fc-область человека, например, Fc-область дикого типа или Fc-область, которая содержит одно или более изменений. В одном варианте осуществления константную область изменяют, например, подвергают мутации, для модификации свойств антитела (например, для увеличения или уменьшения одного или более из: связывания Fc-рецептора, гликозилирования антитела, числа остатков цистеина, функции эффекторных клеток, или функции комплемента). Например, константная область IgG1 человека может быть мутирована по одному или более остаткам, например, одному или более из остатков 234 и 237 (на основе нумерации по Kabat). Антитела могут иметь мутации в области CH2 тяжелой цепи, которые снижают или изменяют эффекторную функцию, например связывание Fc-рецептора и активацию комплемента. Например, антитела могут иметь мутации, такие как описанные в патентах США 5624821 и 5648260. Антитела также могут иметь мутации, которые стабилизируют дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина, такие как мутации в шарнирной области IgG4, как описано в данной области техники (например, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08). См. также, например, U.S. 2005-0037000.

Антитела к PD-1 могут быть в форме полноразмерных антител или в форме низкомолекулярных форм (например, биологически активных фрагментов антител или миниантител) антител к PD-1, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, scFv, и sc(Fv)₂. Другие антитела к PD-1, охватываемые этим описанием, включают однодоменное антитело (одАт), содержащее одну переменную цепь, такую как VH или VL, или их биологически активный фрагмент. См., например, Moller et al., *J. Biol. Chem.*, 285(49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77(1):13-22 (2007); U.S. 2005/0079574 и Davies et al. (1996) *Protein Eng.*, 9(6):531-7. Как и полное антитело, одАт способно избирательно связываться со специфическим антигеном. При молекулярной массе всего 12-15 кДа одАт намного меньше обычных антител и даже меньше, чем фрагменты Fab и одноцепочечные переменные фрагменты.

В данном документе предложены композиции, содержащие смесь антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента и одного или более его кислотных вариантов, например, где количество кислотного варианта(-ов) составляет менее около 80%, 70%, 60%, 60%, 50%, 40%, 30%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1%. Также предложены композиции, содержащие антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее по меньшей мере один сайт дезамидирования, при этом pH композиции составляет от около 5,0 до около 6,5, так что, например, по меньшей мере около 90% антител к PD-1 не дезамидировано (т.е. дезамидировано менее около 10% антител). В определенных

вариантах осуществления дезамидировано менее около 5%, 3%, 2% или 1% антител. рН может составлять от 5,0 до 6,0, например, 5,5 или 6,0. В определенных вариантах осуществления рН композиции составляет 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5.

«Кислотный вариант» представляет собой вариант представляющего интерес полипептида, который является более кислым (например, как определено с помощью катионообменной хроматографии), чем представляющий интерес полипептид. Примером кислотного варианта является дезамидированный вариант.

«Дезамидированный» вариант молекулы полипептида представляет собой полипептид, в котором один или более остатков аспарагина исходного полипептида были преобразованы в аспартат, то есть нейтральная боковая амидная цепь была преобразована в остаток с общими кислотными свойствами.

Термин «смесь», используемый в данном документе по отношению к композиции, содержащей антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, означает присутствие как желаемого антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, так и одного или более их кислотных вариантов. Кислотные варианты могут включать преимущественно дезамидированное антитело к PD-1 с небольшими количествами другого кислотного варианта(-ов).

В определенных вариантах осуществления аффинность связывания (K_D), скорость ассоциации ($K_{D\text{on}}$) и/или скорость диссоциации ($K_{D\text{off}}$) антитела, которое было мутировано для устранения дезамидирования, аналогична таковой для антитела дикого типа, например, с разницей менее чем в около 5 раз, 2 раза, 1 раз (100%), 50%, 30%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% или 1%.

Фрагменты антител

Фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂, F_{ab}c, и F_v) могут быть получены при помощи протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антитела можно получить путем обработки полного антитела ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. Расщепление полных антител папаином приводит к образованию фрагментов F(ab)₂ или Fab; расщепление полных антител пепсином приводит к образованию F(ab')₂ или Fab'; и расщепление полных антител плазмином приводит к образованию фрагментов F_{ab}c.

Альтернативно, фрагменты антител можно получить рекомбинантно. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющие интерес фрагменты антител, могут быть сконструированы, введены в вектор экспрессии и экспрессированы в подходящих клетках-хозяевах. См., например, Co, M.S. et al., J. Immunol., 152:2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. and Skerra, A., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, (1989) 121:663-669 (1989); и Bird, R.E. et al., ПИВТЕСН, 9:132-137 (1991)). Фрагменты антител могут быть экспрессированы и секретированы из E. coli, обеспечивая, таким образом, легкое получение больших

количеств этих фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител. В альтернативном варианте фрагменты Fab'-SH можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с повышенным *in vivo* временем полужизни, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046.

Миниантитела

Миниантитела из антител к PD-1 включают диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)₂ (sc(Fv)₂).

«Диатело» представляет собой двухвалентное миниантитело, сконструированное путем слияния генов (см., например, Holliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:6444-6448 (1993); EP 404097; WO 93/11161). Диатела представляют собой димеры, состоящие из двух полипептидных цепей. Домены VL и VH каждой полипептидной цепи диатела связаны линкерами. Число аминокислотных остатков, составляющих линкер, может составлять от 2 до 12 остатков (например, 3-10 остатков или пять, или около пяти остатков). Линкеры полипептидов в диателе обычно слишком короткие, чтобы позволить VL и VH связываться друг с другом. Таким образом, VL и VH, кодируемые одной и той же полипептидной цепью, не могут образовывать одноцепочечный переменный фрагмент, а вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным переменным фрагментом. В результате у диатела есть два антигенсвязывающих сайта.

ScFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем связывания VH и VL линкером (см., например, Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:5879-5883 (1988); and Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Ed Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). Порядок соединения VH и VL не особенно ограничен, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры расположения включают: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. V-область H-цепи и V-область L-цепи в scFv могут быть получены из любого антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе.

sc(Fv)₂ представляет собой миниантитело, в котором два VH и два VL соединены линкером с образованием единой цепи (Hudson, et al., *J. Immunol. Methods*, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)₂ можно получить, например, путем соединения scFv с линкером. sc(Fv)₂ по настоящему изобретению включают антитела, предпочтительно в которых две VH и две VL расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида; однако порядок двух VH и двух VL не ограничен вышеуказанной схемой, и они могут быть расположены в любом порядке.

Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют

специфичность связывания с по меньшей мере двумя разными эпитопами. Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами белка PD-1. Другие такие антитела могут сочетать сайт связывания PD-1 с сайтом связывания другого белка. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или их низкомолекулярных форм (например, биспецифические антитела в виде $F(ab')_2$, биспецифические антитела в виде $sc(Fv)_2$, биспецифические антитела в виде диатела).

Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, причем две цепи имеют разные специфичности (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). В другом подходе переменные домены антител с желаемой специфичностью связывания сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. ДНК, кодирующие гибриды тяжелой цепи иммуноглобулина и, при желании, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и совместно трансфицируют в подходящую клетку-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в регулировании пропорций трех полипептидных фрагментов. Однако возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда по меньшей мере две полипептидные цепи экспрессируются в равных соотношениях, приводит к высоким выходам.

Согласно другому подходу, описанному в патенте США № US 5731168, поверхность взаимодействия между парой молекул антител может быть сконструирована таким образом, чтобы максимально увеличить процент гетеродимеров, извлеченных из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность взаимодействия содержит по меньшей мере часть домена C_{H3} . В этом способе одну или более небольших боковых цепей аминокислот от поверхности взаимодействия первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие «полости» идентичного или сходного размера с большой боковой цепью(-ями) создаются на поверхности взаимодействия второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот меньшими (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое - с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получить с использованием любых удобных способов сшивания.

Технология «диател» обеспечивает альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител. Фрагменты содержат VH, соединенный с VL линкером, который слишком короткий, чтобы обеспечить объединение двух доменов в одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены объединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым

образуя два антигенсвязывающих сайта.

Мультивалентные антитела

Мультивалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем бивалентное антитело. Описанные в данном документе антитела могут быть мультивалентными антителами с тремя или более сайтами связывания антигена (например, четырехвалентными антителами), которые могут быть легко получены путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Мультивалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих сайтов. Иллюстративный домен димеризации содержит (или состоит из) Fc-область или шарнирную область. Мультивалентное антитело может содержать (или состоять из) от трех до около восьми (например, четырех) сайтов связывания антигена. Мультивалентное антитело необязательно содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (например, по меньшей мере две полипептидные цепи), где полипептидная цепь(-и) содержит два или более переменных домена. Например, полипептидная цепь(-и) может содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислотный или пептидный спейсер, а n равен 0 или 1.

Конъюгированные антитела

Описанные в данном документе антитела могут представлять собой конъюгированные антитела, которые связаны с различными молекулами, включая макромолекулярные вещества, такие как полимеры (например, полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленимин (PEI), модифицированный с PEG (PEI-PEG), полиглутаминовая кислота (PGA) (сополимеры N-(2-гидроксипропил) метакриламида (HPMA)), гиалуроновая кислота, радиоактивные вещества (например, ^{90}Y , ^{131}I), флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, гаптены, ферменты, хелаты металлов, лекарственные средства и токсины (например, кальхеамицин, экзотоксин A *Pseudomonas*, рицин (например, А-цепь дегликозилированного рицина)).

В одном варианте осуществления для улучшения цитотоксического действия антител к PD-1 и, следовательно, их терапевтической эффективности, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включая радиоизотопы и цитотоксические агенты. Эти конъюгаты могут избирательно доставлять токсическую нагрузку в целевой сайт (т.е. клетки, экспрессирующие антиген, распознаваемый антителом), в то время как клетки, которые не распознаются антителом, сохраняются. Чтобы свести к минимуму токсичность, конъюгаты, как правило, конструируют на основе молекул с коротким временем полужизни в сыворотке (таким образом, используются мышиные последовательности и изоформы IgG3 или IgG4).

В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент модифицируют фрагментом, который улучшает его

стабилизацию и/или удержание в системе кровообращения, например, в крови, сыворотке или других тканях, например, в по меньшей мере 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент может быть связан (например, конъюгирован с) полимером, например, по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры будут существенно различаться по массе. Можно использовать полимеры, имеющие среднечисловую молекулярную массу в диапазоне от около 200 до около 35000 Дальтон (или от около 1000 до около 15000, и от 2000 до около 12500). Например, антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно конъюгировать с водорастворимым полимером, например, с гидрофильным поливиниловым полимером, например, с поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (PEG) или полипропиленгликоли, полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что растворимость блок-сополимеров в воде сохраняется. Дополнительные полезные полимеры включают полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен, и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; полиметакрилаты; карбомеры; и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Вышеописанные конъюгированные антитела могут быть получены путем проведения химических модификаций антител или их форм с более низкой молекулярной массой, описанных в данном документе. Способы модификации антител хорошо известны в данной области техники (например, US 5057313 и US 5156840).

Способы получения антител

Антитела могут быть получены в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, например, Fab, могут быть получены в бактериальных клетках, например, клетках *E. coli*. Антитела также могут быть получены в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (например, CHO, 293E, COS). Кроме того, антитела (например, scFv) могут быть экспрессированы в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* (см., например, Powers et al., *J Immunol Methods*. 251:123-35 (2001)), *Hansenula*, или *Saccharomyces*. Чтобы получить представляющее интерес антитело, конструируют полинуклеотид, кодирующий антитело, вводят его в вектор экспрессии и затем экспрессируют его в подходящих клетках-хозяевах. Для приготовления рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела используются стандартные методы молекулярной биологии.

Если антитело должно быть экспрессировано в бактериальных клетках (например, *E. coli*), вектор экспрессии должен иметь характеристики, которые позволяют амплифицировать вектор в бактериальных клетках. Дополнительно, когда такую *E. coli*, как JM109, DH5 α , HB101 или XL1-Blue, применяют в качестве хозяина, вектор должен иметь промотор, например, промотор lacZ (Ward et al., 341:544-546 (1989), промотор araB

(Better et al., *Science*, 240:1041-1043 (1988)) или промотор T7, который может обеспечить эффективную экспрессию в *E. coli*. Примеры подобных векторов включают, например, векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), «систему QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP и pET (когда применяют этот вектор экспрессии, хозяин предпочтительно представляет собой BL21, экспрессирующий РНК-полимеразу T7). Для экспрессии антител вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность. Для продуцирования *E. coli* в периплазме, в качестве сигнальной для секреции антител последовательности может быть применена сигнальная последовательность *pelB* (Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169:4379 (1987)). Для бактериальной экспрессии могут быть использованы методы с использованием хлорида кальция или методы электропорации для введения вектора экспрессии в бактериальную клетку.

Если антитело должно экспрессироваться в клетках животных, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, вектор экспрессии содержит промотор, необходимый для экспрессии в этих клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature*, 277:108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)), или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017). Например, селективируемый маркерный ген обычно придает устойчивость по отношению к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен вектор. Примеры векторов с селективируемыми маркерами включают pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

В одном варианте осуществления антитела вырабатываются в клетках млекопитающих. Иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессирования антитела включают клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO) (в том числе клетки dhfr⁻ CHO, описанные в Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, используемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621) клетки почки эмбриона человека 293 (например, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, лимфоцитарные клеточные линии, например, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетку от трансгенного животного, например, трансгенного млекопитающего. Например, клетка представляет собой эпителиальную клетку молочной железы.

В иллюстративной системе для экспрессии антител, рекомбинантный вектор экспрессии кодирующий обе, тяжелую и легкую, цепи антитела к PD-1 (например, антитела X), вводят в клетки dhfr⁻ CHO посредством опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В пределах рекомбинантного вектора экспрессии каждый из генов тяжелой

и легкой цепи антитела функционально связан с регуляторными элементами энхансера/промотора (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и подобного, такими как регуляторный элемент энхансера CMV/промотора AdMLP или регуляторный элемент энхансера SV40/промотора AdMLP) для управления высокими уровнями транскрипции генов. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, который делает возможным селекцию клеток CHO, которые были трансфицированы вектором с использованием селекции/амплификации с помощью метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, и выделяют антитело из культуральной среды.

Антитела также могут вырабатываться трансгенным животным. Например, в патенте США № US 5849992 описан способ экспрессирования антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который содержит специфический по отношению к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, вырабатываемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит в себе представляющее интерес секретлируемое антитело. Антитело может быть очищено от молока или использовано непосредственно для некоторых применений. Также предлагаются животные, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Антитела по настоящему раскрытию могут выделяться внутрь или наружу (например, в среде) клетки-хозяина и очищены до по существу чистых и гомогенных антител. Для выделения и очистки антител могут быть использованы методы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител, и не ограниченные каким-либо конкретным способом. Антитела могут быть выделены и очищены с помощью соответствующего выбора и комбинирования, например, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителями, экстракции растворителями, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в SDS-полиакриламидном геле, изоэлектрического фокусирования, диализа и перекристаллизации. Хроматография включает, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, обращенно-фазовую хроматографию и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматография может быть проведена с использованием жидкофазной хроматографии, такой как ВЭЖХ и FPLC. Колонки, применяемые для аффинной хроматографии, включают колонку с белком А и колонку с белком G. Примеры колонок с использованием колонки с белком А включают Hyper D, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Настоящее описание также включает антитела, которые являются высокоочищенными с использованием указанных способов очистки.

Антитела к PD-1 с измененным гликозилированием

Различные гликоформы могут существенно влиять на свойства терапевтического средства, включая фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие рецепторов и тканеспецифическое нацеливание (Graddis et al., 2002, *Curr Pharm Biotechnol.* 3: 285-297). В частности, для антител структура олигосахарида может влиять на свойства, относящиеся к устойчивости к протеазам, время полужизни антитела в сыворотке, опосредованное рецептором FcRn, фагоцитоз и обратную связь антитела, в дополнение к эффекторным функциям антитела (например, связывание с комплексом C1 комплемента, который индуцирует КЗЦ, и связывание с рецепторами FcγR, которые отвечают за модуляцию пути АЗКЦ) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, *PNAS*, 89: 4285-4289).

Соответственно, другой способ модуляции эффекторной функции антител включает изменение гликозилирования константной области антитела. Измененное гликозилирование включает, например, уменьшение или увеличение количества гликозилированных остатков, изменение структуры или расположения гликозилированных остатков, а также изменение структуры (структур) сахара. Олигосахариды, обнаруженные в IgG человека, влияют на степень их эффекторной функции (Raju, T.S. *BioProcess International* April 2003. 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как КЗЦ и АЗКЦ, связывание с различными Fc-рецепторами и связывание с белком C1q (Wright A. & Morrison SL. *TIBTECH* 1997, 15 26-32; Shields et al. *J Biol Chem.* 2001 276(9):6591-604; Shields et al. *J Biol Chem.* 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et al. *J Biol Chem.* 2003 278(5):3466-73; Umana et al. *Nat Biotechnol.* 1999 Feb; 17(2): 176-80). Например, способность IgG связывать C1q и активировать каскад комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводного фрагмента, расположенного между двумя доменами CH2 (который обычно закреплен на Asn297) (Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995)).

Сайты гликозилирования в Fc-содержащем полипептиде, например, в антителе, таком как антитело IgG, можно идентифицировать с помощью стандартных методик. Идентификация сайта гликозилирования может быть экспериментальной или основана на анализе последовательности или данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, то есть аминокислотная последовательность, распознаваемая различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусным мотивом для мотива N-связанного гликозилирования часто является NXT или NXS, где X может представлять собой любую аминокислоту, кроме пролина. Также описано несколько алгоритмов локализации потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, чтобы идентифицировать потенциальные сайты гликозилирования в пределах антитела или Fc-содержащего фрагмента, последовательность антитела исследуется, например, с использованием общедоступных баз данных, например веб-сайта, предоставленного Центром анализа биологических последовательностей (см. сервисы NetNGlyc для прогнозирования сайтов

N-связанного гликозилирования и сервисы NetOGlyc для прогнозирования сайтов O-связанного гликозилирования).

In vivo исследования подтвердили снижение эффекторной функции агликозильных антител. Например, агликозильные антитела к CD8 не способны истощать CD8-несущие клетки у мышей (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062) и агликозильные антитела к CD3 не вызывают синдром высвобождения цитокинов у мышей или людей (Boyd, 1995 *выше*; Friend, 1999 Transplantation 68:1632). Агликозилированные формы антитела к PD-1 также обладают пониженной эффекторной функцией.

Важно отметить, что хотя удаление гликанов в домене CH2, по-видимому, оказывает значительное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антитела остаются неизменными. В частности, было показано, что удаление гликанов практически не влияет на время полужизни в сыворотке и связывание с антигеном (Nose, 1983 *выше*; Тао, 1989 *выше*; Dorai, 1991 *выше*; Hand, 1992 *выше*; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949).

Антитела к PD-1 по настоящему изобретению можно модифицировать или изменять, чтобы вызвать усиление или снижение эффекторной функции(-й) (по сравнению со вторым антителом, специфическим к PD-1). Способы изменения сайтов гликозилирования антител описаны, например, в US 6350861 и US 5714350, WO 05/18572 и WO 05/03175; эти способы можно использовать для получения антител к PD-1 по настоящему изобретению с измененным, уменьшенным гликозилированием или без него.

Показания

Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно использовать для лечения или профилактики различных заболеваний, включая злокачественное новообразование. Злокачественные новообразования, которые можно лечить или предотвращать при помощи введения антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, включают следующее: рак надпочечников, рак анального канала, СПИД-ассоциированный рак, альвеолярная саркома мягких тканей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного и спинного мозга, рак груди, опухоль каротидного тельца, рак шейки матки, хондросаркома, хордома, хромофобная почечно-клеточная карцинома, светлоклеточная карцинома, рак толстой кишки, колоректальный рак, доброкачественная фиброзная гистиоцитома кожи, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль, эпендимома, рак эндометрия, опухоль Юинга, внескелетная миксоидная хондросаркома, несовершенный фиброгенез, фиброзная дисплазия костей, рак желчного пузыря или желчных протоков, рак желудочно-кишечного тракта, гестационная трофобластическая болезнь, герминогенная опухоль рак головы и шеи, гепатоцеллюлярная карцинома, инсулома, саркома Капоши, рак почки, лейкоз, липома/доброкачественная липоматозная опухоль, липосаркома/злокачественная липоматозная опухоль, рак печени, лимфома, рак легкого, медуллобластома, меланома, менингиома, карцинома из клеток Меркеля, множественные эндокринные неоплазии, множественная миелома, миелодиспластический синдром, нейробластома,

нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярная карцинома щитовидной железы, опухоль околощитовидной железы, рак в детском возрасте, опухоль оболочек периферических нервов, феохромоцитома, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, задняя увеальная меланома, редкое гематологическое заболевание, метастатический рак почки, рабдоидная опухоль, рабдомисаркома, саркома, рак кожи, саркома мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальная саркома, рак яичек, карцинома тимуса, тимома, метастатический рак щитовидной железы, и рак матки.

В частности, антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, можно использовать при лечении рака анального канала, рака мочевого пузыря, рака груди, колоректального рака, рака эндометрия, гепатоцеллюлярной карциномы, глиомы, рака почки, рака легкого, карциномы из клеток Меркеля, множественной миеломы, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака прямой кишки и саркомы.

В частности, антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно использовать при лечении рака эндометрия (включая недифференцированный рак эндометрия, рак эндометрия с высокой MSI, рак эндометрия с dMMR и/или положительный по мутации в экзонуклеазном домене POLE рак эндометрия), саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) или рак шейки матки.

Плоскоклеточная карцинома анального канала

Плоскоклеточная карцинома анального канала (SCAC) составляет почти 3% случаев злокачественных новообразований пищеварительной системы, и ее частота увеличивается из-за связи с ВПЧ и ВИЧ-инфекцией. Хотя большинство пациентов имеют локализованное заболевание, системные метастазы будут развиваться у около 25% пациентов, а 5-летняя выживаемость у этих индивидуумов низкая. Резервная химиотерапия с использованием схем на основе платины является общепринятым стандартом лечения; однако ответ на лечение непродолжительный, а общая выживаемость без прогрессирования после этих способов лечения измеряется только месяцами. Не существует общепринятых резервных способов лечения пациентов, у которых наблюдается прогрессирование после химиотерапии первой линии.

Карцинома из клеток Меркеля

Карцинома из клеток Меркеля представляет собой редкое, агрессивное кожное злокачественное новообразование, связанное с множеством факторов, таких как полиомавирус клеток Меркеля, УФ-облучение и иммуносупрессия. Это заболевание, как правило, обнаруживают у пожилых людей со светлым типом кожи и имеет плохой прогноз с более низкими показателями выживаемости по сравнению с другими злокачественными новообразованиями кожи. Хирургическое вмешательство и/или радиотерапия показаны и потенциально излечивают местно-регионарное заболевание, а рецидивы являются обычным явлением.

5-летняя выживаемость пациентов с ККМ составляет 75%, 59% и 25% для первичных локализованных опухолей, опухолей с метастазами в регионарные лимфатические узлы (или локальных рецидивов) и опухолей с отдаленными метастазами, соответственно. Более чем у 30% пациентов разовьется заболевание с отдаленными метастазами, а 5-летняя выживаемость для этих пациентов составляет всего около 10%.

Исторически метастатический ККМ лечили с применением схем химиотерапии, аналогичных тем, которые используются при мелкоклеточном раке легкого. Химиотерапия на основе платины обеспечивает высокую частоту начального ответа и имеет короткую продолжительность. Химиотерапия при этом заболевании никогда не продемонстрировала преимуществ в выживаемости. Химиотерапия также связана с риском тяжелой токсичности и смерти от интоксикации, особенно среди пожилых пациентов.

Рак эндометрия

Рак эндометрия является четвертым по распространенности злокачественным новообразованием, поражающим американских женщин: по оценкам, было диагностировано 60050 новых случаев; по оценкам, произойдет 10470 смертей, связанных с раком эндометрия, что сделает его шестым по частоте смертей, связанных со злокачественным новообразованием, среди американских женщин. Во всем мире это четвертая по частоте причина смерти женщин от злокачественного новообразования. Рак эндометрия является наиболее частым гинекологическим злокачественным новообразованием у женщин, причем аденокарцинома является наиболее частым гистологическим заболеванием. Злокачественные новообразования, диагностированные на ранней стадии, имеют хороший прогноз с вариантами лечения в виде хирургического вмешательства и/или радиотерапии, но агрессивное злокачественное новообразование на поздней стадии имеет ограниченное число вариантов лечения, с пятилетней выживаемостью в диапазоне от 20 до 60%. Стандартные методы лечения местнораспространенного или метастатического злокачественного новообразования включают системные способы лечения, такие как гормональная терапия, химиотерапия с использованием одного агента, например, доксорубицина, или комбинированные схемы химиотерапии на основе платины, такие как карбоплатин и доцетаксел. Учитывая неблагоприятный долгосрочный прогноз для этих пациентов, необходимы дополнительные и новые способы лечения.

Фармацевтические композиции

Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде фармацевтической композиции для введения субъекту, например, для лечения расстройства, описанного в данном документе. Как правило, фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие

всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Композиция может содержать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения основания или соль присоединения основания (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Фармацевтический состав относится к хорошо известной области техники, которая дополнительно описана, например, в Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); и Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Обычно композиции для агентов, описанных в данном документе, находятся в форме растворов для инъекций или инфузий.

Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения агента, описанного в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения агента, описанного в данном документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к образованию порошка агента, описанного в данном документе, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Продленное всасывание композиций для инъекций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно приготовить с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, и микроинкапсулированные системы доставки.

Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы приготовления таких составов запатентованы или общеизвестны. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Введение

Антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту, например, субъекту, который в этом нуждается, например, человеку, различными способами. Для многих применений путь введения является одним из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (в/в), подкожная инъекция (п/к), внутривентрикулярная (в/б) или внутримышечная инъекция. Также возможно применение внутрисуставной доставки. Также можно использовать другие способы парентерального введения. Примеры таких способов включают: внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интракапсулярную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, интракапсулярную, субарахноидальную, субкапсулярную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию. В некоторых случаях введение может быть пероральным.

Путь и/или способ введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента также могут быть адаптированы для конкретного случая, например, путем наблюдения за субъектом, например, с использованием томографической визуализации, например, для визуализации опухоли.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе мг/кг массы пациента. Доза также может быть выбрана так, чтобы уменьшить или избежать продукции антител против антитела к PD-1. Схемы применения корректируют для обеспечения желаемого ответа, например, терапевтического ответа или комбинаторного терапевтического эффекта. Как правило, дозы антитела к PD-1 (и, необязательно, второго агента) можно использовать для обеспечения субъекта агентом в биодоступных количествах. Например, дозы в диапазоне около 0,1-100 мг/кг, около 0,5-100 мг/кг, около 1 мг/кг -100 мг/кг, около 0,5-20 мг/кг, около 0,1-10 мг/кг, или можно вводить около 1-10 мг/кг. Также можно использовать другие дозы. В конкретных вариантах осуществления субъекту, нуждающемуся в лечении антителом к PD-1, вводят антитело в дозе около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг или около 40 мг/кг. В отношении доз или дозировок, термин «около» предназначен для обозначения диапазона, который составляет $\pm 10\%$ от заявленной дозы, так что, например, доза около 3 мг/кг будет составлять от 2,7 мг/кг до 3,3 мг/кг массы пациента.

Композиция может содержать от около 1 мг/мл до 100 мг/мл или от около 10 мг/мл до 100 мг/мл, или от около 50 до 250 мг/мл, или от около 100 до 150 мг/мл, или от около 100 до 250 мг/мл антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В контексте данного документа единичная дозированная форма, или «фиксированная доза», или «постоянная доза» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем и, необязательно, в сочетании с другим агентом. Могут быть предложены одна или множество дозировок. Альтернативно или дополнительно антитело можно вводить путем непрерывной инфузии. Иллюстративные фиксированные дозы включают около 375 мг, около 500 мг и около 750 мг. В некоторых вариантах осуществления в отношении доз или дозировок термин «около» предназначен для обозначения диапазона, который составляет $\pm 10\%$ от заявленной дозы, так что, например, доза около 375 мг будет составлять от 337,5 мг до 412,5 мг.

Дозу антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента можно вводить, например, с периодическим интервалом в течение периода времени (курса лечения), достаточного, чтобы охватить по меньшей мере 2 дозы, 3 дозы, 5 доз, 10 доз или более, например, один или два раза в день, или от около одного до четырех раз в неделю, или предпочтительно еженедельно, раз в две недели (каждые две недели), раз в три недели, ежемесячно, например, в течение от около 1 до 12 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от около 3 до 7 недель и даже более предпочтительно от около 4, 5 или 6 недель. Факторы, которые могут влиять на дозировку и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включают, например, степень тяжести заболевания или расстройства, состав, способ доставки, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, а также другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством соединения может включать однократное лечение или, предпочтительно, может включать серию курсов лечения.

Иллюстративный режим дозирования включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в фиксированной дозе около 375 мг один раз в 3 недели. Другой иллюстративный режим дозирования включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в фиксированной дозе около 500 мг один раз в 4 недели. Еще один иллюстративный режим дозирования включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в фиксированной дозе около 750 мг один раз в 4 недели.

Иллюстративный режим дозирования на основе массы включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе около 1 мг/кг один раз в 2 недели. Другой иллюстративный режим дозирования на основе массы включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе около 3 мг/кг один раз в 2 недели. Другой иллюстративный режим дозирования на основе массы включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе около 3 мг/кг один раз в 4 недели. Другой иллюстративный режим дозирования на основе массы

включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе около 10 мг/кг один раз каждые 2 недели. Другой иллюстративный режим дозирования на основе массы включает введение антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе около 10 мг/кг один раз каждые 4 недели.

Фармацевтическая композиция может содержать «терапевтически эффективное количество» агента, описанного в данном документе. Такие эффективные количества можно определить на основании эффекта введенного агента или комбинаторного эффекта агентов, если используется более одного агента. Терапевтически эффективное количество агента также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность соединения вызывать желаемый ответ у индивидуума, например, улучшение по меньшей мере одного параметра расстройства или улучшение по меньшей мере одного симптома расстройства. Терапевтически эффективное количество также является таким, в котором любые токсичные или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

Далее представлены примеры осуществления на практике настоящего изобретения. Они никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры представлены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения и не должны интерпретироваться как ограничивающие объем изобретения. В том объеме, в котором упоминаются конкретные материалы, они приведены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные средства или реагенты, не проявляя изобретательских способностей и не выходя за пределы объема изобретения.

Пример 1. Исследование фазы 2 антитела X у участников с плоскоклеточной карциномой анального канала (SCAC), у которых выявили прогрессирование после химиотерапии на основе платины

Это открытое, одностороннее, многоцентровое исследование фазы 2 для участников с местнораспространенным или метастатическим SCAC, у которых выявили прогрессирование при стандартном режиме химиотерапии на основе платины. Участники с хорошо контролируемой ВИЧ-инфекцией удовлетворяют критериям включения. Все участники получают антитело X в рекомендованной для фазы 2 дозе 500 мг в/в один раз в четыре недели (Q4W). Первичной конечной точкой является ЧОО, как определено независимой централизованной оценкой с использованием RECIST v1.1.

Исследование состоит из 3 периодов: скрининг, лечение исследуемыми лекарственными средствами и последующее наблюдение. Лечение может продолжаться до 2 лет при отсутствии клинического прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности, смерти, отзыва информированного согласия, невозможности последующего наблюдения вследствие утери контакта или преждевременного прекращения лечения по

любой другой причине.

Участники, достигшие полного ответа, могут прекратить прием антитела X после 2 дополнительных циклов после консультации с медицинским монитором.

Лечение проводят путем внутривенной инфузии в течение 60 минут в 1-й день каждого 28-дневного цикла. Последующие циклы лечения следует отложить (до 12 недель) до тех пор, пока не будут выполнены следующие критерии:

- Гемоглобин ≥ 8 г/дл.
- АКН $\geq 1,0 \times 10^9$ /л.
- Количество тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9$ /л.
- АЛТ/АСТ/билирубин ≤ 2 степени.
- Устранение всей токсичности, действующей на иммунную систему, до ≤ 1 степени (за исключением эндокринопатии, которая контролируется гормональной заместительной терапией), за исключением неприемлемой токсичности.
- Устранение всей токсичности, действующей на неиммунную систему, до ≤ 1 степени или исходного уровня (за исключением алопеции или независимой от трансфузии анемии). Временное бессимптомное повышение лабораторных показателей ≤ 3 степени не требует прерывания или снижения дозы, если у участника нет симптомов, а повышение является клинически несущественным и обсуждается с медицинским монитором (например, амилаза, липаза).
- Суточная доза кортикостероидов ≤ 10 мг преднизона или его эквивалента.

Период последующего наблюдения начинается после того, как участник завершил 2 года применения исследуемого лекарственного средства или преждевременно прекратил применение исследуемого лекарственного средства. Участники оцениваются на предмет нежелательных явлений в течение 90 дней после приема последней дозы исследуемого лекарственного средства или до начала другой противоопухолевой терапии, в зависимости от того, что произойдет раньше.

После того, как участники прекращают лечение, они включаются в период последующего наблюдения и оцениваются на выживаемость до завершения исследования. Участники, которые прекращают лечение в рамках исследования без прогрессирования заболевания, будут включены в период последующего наблюдения и продолжат проходить оценку опухоли в соответствии с графиком проведения мероприятий до тех пор, пока не обнаружится прогрессирование заболевания, не начнут новое противоопухолевое лечение, не отзовут информированное согласие, последующее наблюдение будет невозможным вследствие утери контакта или до тех пор, пока не будет зафиксирован случай смерти.

Для НЯ разрешены модификации дозы антитела X. Перед началом каждого цикла лечения участник должен соответствовать критериям продолжения лечения перед введением антитела X. Если критерии не соблюдены в начале цикла лечения, инфузия антитела X может быть отложена до 12 недель для устранения любых аномальных лабораторных результатов или НЯ. Участников следует исключить из активной части

исследования, если критерии повторного лечения не будут выполнены в течение 12 недель после запланированного начала цикла. После устранения несоответствия критериям участники могут возобновить лечение, если нет патологического состояния или других обстоятельств, которые, по мнению исследователя, сделали бы участника непригодным для дальнейшего участия в исследовании. Если применение антитела X необходимо прекратить из-за неприемлемой токсичности, участник должен быть отстранен от активного лечения и переведен на период последующего наблюдения в исследовании.

Пример 2. Фаза 2 исследования антитела X у пациентов с метастатической карциномой из клеток Меркеля (ККМ)

Это открытое, несравнительное, многоцентровое исследование фазы 2, предназначенное для оценки клинической активности и безопасности антитела X у участников с метастатической ККМ. В это исследование будут включены участники с метастатическим ККМ, в том числе те, кто ранее не проходил химиотерапию, а также те, кто ранее получал химиотерапию и которые в остальном соответствуют всем критериям включения. Все участники должны предоставить образцы тканей (свежие или архивные) на централизованную оценку патологии. Участники, у которых ККМ не подтверждена данными патологического исследования, могут остаться на исследуемом лечении, но будут заменены другими для анализа эффективности.

Все участники, отвечающие критериям отбора во время скрининга, получат лечение антителом X. Первичной конечной точкой является ЧОО, как определено ICR (независимой централизованной проверкой) в соответствии с RECIST v1.1.

Исследуемое лечение будет состоять из монотерапии антителом X, вводимой в рекомендованной для Фазы 2 дозе 500 мг путем внутривенной инфузии один раз в 28 дней. Лечение исследуемым лекарственным средством может продолжаться до 2 лет при отсутствии клинического прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности, смерти, отзыва информированного согласия, невозможности последующего наблюдения вследствие утери контакта или преждевременного прекращения лечения по любой другой причине.

Исследование состоит из 3 периодов: скрининг, лечение исследуемыми лекарственными средствами и последующее наблюдение.

Соответствующие критериям участники получат лечение монотерапией антителом X в дозе 500 мг, вводимой в/в в течение 60 минут в 1-й день каждого 28-дневного цикла. Критерии до начала лечения, которые должны соблюдаться в каждом цикле, включают следующее:

Гемоглобин ≥ 8 г/дл

АКН $\geq 1,0 \times 10^9/\text{л}$

Количество тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9/\text{л}$

АЛТ/АСТ/билирубин ≤ 2 степени

Устранение всей токсичности, действующей на иммунную систему, до ≤ 1 степени (за исключением эндокринопатии, которая контролируется гормональной заместительной терапией)

Устранение всей токсичности, действующей на неиммунную систему, до ≤ 1 степени или исходного уровня (за исключением алопеции или независимой от трансфузии анемии). Временное бессимптомное повышение лабораторных показателей ≤ 3 степени не требует прерывания или снижения дозы, если у участника нет симптомов, и если повышение клинически незначительно и обсуждается с медицинским монитором.

Период последующего наблюдения начинается после того, как участник завершил или преждевременно прекратил применение исследуемого лекарственного средства. Участников оценивают на предмет НЯ и других параметров безопасности в течение 90 дней после приема последней дозы исследуемого лекарственного средства.

После того как участники прекращают лечение, они включаются в период последующего наблюдения и будут оцениваться на выживаемость до завершения исследования. Участники, которые прекращают лечение в рамках исследования без прогрессирования заболевания, будут включены в период последующего наблюдения и продолжат проходить оценку опухоли в соответствии с графиком проведения мероприятий до тех пор, пока не обнаружится прогрессирование заболевания, не начнут новое противоопухолевое лечение, не отзовут информированное согласие, последующее наблюдение будет невозможным вследствие утери контакта или до тех пор, пока не будет зафиксирован случай смерти.

Для НЯ разрешены модификации дозы антитела X. Перед началом каждого цикла лечения участник должен соответствовать критериям продолжения лечения перед введением антитела X. Если критерии не соблюдены в начале цикла лечения, инфузия антитела X может быть отложена до 12 недель для устранения любых аномальных лабораторных результатов или НЯ. Участников следует исключить из активной части исследования, если критерии повторного лечения не будут выполнены в течение 12 недель после запланированного начала цикла. После устранения несоответствия критериям участники могут возобновить лечение, если нет патологического состояния или других обстоятельств, которые, по мнению исследователя, сделали бы участника непригодным для дальнейшего участия в исследовании. Если применение антитела X необходимо прекратить из-за неприемлемой токсичности, участник должен быть отстранен от активного лечения и переведен на период последующего наблюдения в исследовании.

Пример 3. Исследование фазы 1 по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетики антитела X у пациентов с раком эндометрия

Это исследование представляет собой открытое исследование фазы 1, исследование с повышением дозы и расширением когорты, разработанное для определения характеристик безопасности, переносимости, ФК, ФД, иммуногенности и предварительной противоопухолевой активности антитела X, вводимого в/в каждые две

или четыре недели, у пациентов с рецидивирующими/рефрактерными, неоперабельными местнораспространенными или метастатическими солидными опухолями.

Исследование состоит из двух фаз: фазы повышения дозы и фазы расширения когорты.

Всем пациентам, включенным в исследование, антитело X вводят путем внутривенной инфузии в течение 60 минут. Для целей определения интервала лечения на протяжении данного исследования один цикл определяется как 28 дней или четыре (4) недели. Две схемы введения антитела X будут изучены на фазах повышения дозы и расширения когорты: один раз в две недели (Q2W) или один раз в четыре недели (Q4W); кроме того, схема введения постоянных/фиксированных доз антитела X (Q4W) будет изучаться только во время фазы расширения. Как для фазы повышения дозы, так и для фазы расширения когорты оценки опухоли у пациентов будут проводиться каждые два цикла (8 недель) в течение первых шести циклов (24 недели), а затем каждые три цикла (12 недель) после этого до визита окончания лечения; эти обследования можно проводить в течение 7 дней до окончания соответствующих циклов. Предполагая, что пациент остается клинически стабильным, у него нет прогрессирования заболевания, связанного с иммунной системой, (irPD) и нет неприемлемой токсичности, которая требует окончательного прекращения применения исследуемого лекарственного средства, лечение антителом X может продолжаться до 24 циклов (~ 2 года). После введения последней дозы исследуемого лекарственного средства все пациенты будут наблюдаться в течение 30-дневного периода последующего наблюдения для оценки безопасности и каждые 6 месяцев в течение 2-летнего периода последующего наблюдения для оценки выживаемости.

В когорту рака эндометрия включены как минимум 10 пациентов с заболеванием с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H), дефицитом коррекции неспаренных оснований (dMMR) и/или заболеванием, положительным по мутации в экзонуклеазном домене ДНК-полимеразы ϵ (POLE).

Пациенты получают 3 мг/кг антитела X один раз в 2 или 4 недели (или 1 мг/кг Q2W, или 10 мг/кг Q2W, или 10 мг/кг Q4W) в дозах, установленных для этой схемы применения из фазы повышения дозы в исследовании. Пациенты в когортах с фиксированной дозой получают антитело X или в дозе 500 мг Q4W, или 750 мг Q4W.

Пример 4. Исследование фазы 1 по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетики антитела X у пациентов со злокачественным новообразованием

Это исследование представляет собой открытое исследование фазы 1, исследование с повышением дозы и расширением когорты, разработанное для определения характеристик безопасности, переносимости, ФК, ФД, иммуногенности и предварительной противоопухолевой активности антитела X, вводимого в/в каждые две, три, или четыре недели, у пациентов с рецидивирующими/рефрактерными, неоперабельными местнораспространенными или метастатическими солидными опухолями.

Исследование состоит из двух фаз: фазы повышения дозы и фазы расширения когорты.

Всем пациентам, включенным в исследование, антитело X вводят путем внутривенной инфузии в течение 60 минут. Для целей определения интервала лечения на протяжении данного исследования 1 цикл определяется как 28 дней или 4 недели для пациентов, получающих дозы Q2W или Q4W. Для пациентов, получающих дозы Q3W, 1 цикл определяется как 21 день или 3 недели. Как для фазы повышения дозы, так и для фазы расширения когорты оценки опухоли будут проводиться каждые 8 недель в течение первых 24 недель для пациентов, получавших дозы Q2W или Q4W, и каждые 9 недель в течение первых 27 недель для пациентов, получавших дозы Q3W, а затем каждые 12 недель до визита окончания лечения; эти обследования можно проводить в течение 7 дней до окончания соответствующих циклов. Предполагая, что пациент остается клинически стабильным, у него нет клинического прогрессирования и нет неприемлемой токсичности, которая требует окончательного прекращения применения исследуемого лекарственного средства, лечение антителом X может продолжаться до 2 лет. После введения последней дозы исследуемого лекарственного средства все пациенты будут наблюдаться в течение 30-дневного периода последующего наблюдения для оценки безопасности и каждые 6 месяцев в течение 2-летнего периода последующего наблюдения для оценки выживаемости.

В фазе повышения дозы антитело X будут оценивать с последовательным повышением доз. Уровни доз антитела X, которые необходимо оценить, включают 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг с интервалом один раз в две недели (Q2W) или один раз в четыре недели (Q4W). Например, пациенты могут получать антитело X в дозах 1 мг/кг Q2W, 3 мг/кг Q2W, 3 мг/кг Q4W, 10 мг/кг Q2W или 10 мг/кг Q4W в дозах, установленных для этой схемы применения из фазы повышения дозы в исследовании.

Фаза расширения когорты будет включать опухолеспецифические когорты, включая пациентов с раком эндометрия (недифференцированным, с высоким MSI и dMMR), саркомой мягких тканей, немелкоклеточным раком легкого, раком шейки матки, и когорты с любой гистологией опухолей (опухоль-неспецифические). Уровни доз антитела X, которые необходимо оценить, включают 3 мг/кг один раз в две недели, например, 3 мг/кг Q2W, и введение постоянных/фиксированных доз антитела X в 375 мг, 500 мг и 750 мг один раз в три недели или четыре недели, например, 375 мг Q3W, 500 мг Q4W или 750 мг Q4W.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Хотя настоящее изобретение было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака эндометрия у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

2. Способ по п. 1, в котором рак эндометрия представляет собой рак эндометрия с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H).

3. Способ по п. 1, в котором рак эндометрия представляет собой рак эндометрия с дефицитом коррекции неспаренных оснований (dMMR).

4. Способ по п. 1, в котором рак эндометрия представляет собой положительный по мутации в экзонуклеазном домене ДНК-полимеразы ϵ (POLE) рак эндометрия.

5. Способ лечения карциномы из клеток Меркеля у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3

VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

6. Способ лечения рака анального канала у человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение человеку терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 1 мг/кг один раз в 2 недели.

8. Способ по любому из пп. 1-6, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 3 мг/кг один раз в 2 недели.

9. Способ по любому из пп. 1-6, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 3 мг/кг один раз в 4 недели.

10. Способ по любому из пп. 1-6, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 10 мг/кг один раз в 2 недели.

11. Способ по любому из пп. 1-6, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 10 мг/кг один раз в 4 недели.

12. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта-человека, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту-человеку терапевтически эффективной фиксированной дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, в котором

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

в котором антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

13. Способ по п. 12, в котором злокачественное новообразование представляет собой рак анального канала, рак мочевого пузыря, рак груди, колоректальный рак, рак эндометрия, гепатоцеллюлярную карциному, глиому, рак почки, рак легкого, карциному из клеток Меркеля, множественную миелому, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки или саркому.

14. Способ по п. 13, в котором рак эндометрия выбран из группы, состоящей из рака эндометрия с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H), рака эндометрия с дефицитом коррекции неспаренных оснований (dMMR) и положительного по мутации в экзонуклеазном домене ДНК-полимеразы ϵ (POLE) рака эндометрия.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором домен VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

16. Способ по любому из пп. 1-14, в котором антитело содержит тяжелую цепь, и в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

17. Способ по любому из пп. 1-14, в котором домен VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

18. Способ по любому из пп. 1-14, в котором антитело содержит легкую цепь, и в котором легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

19. Способ по любому из пп. 1-14, в котором домен VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, а домен VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

20. Способ по любому из пп. 1-14, в котором антитело содержит тяжелую цепь и

легкую цепь, и в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

21. Способ по любому из пп. 1-14, в котором антитело представляет собой гуманизованное антитело.

22. Способ по любому из пп. 1-14, в котором антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scF_v, sc(F_v)₂ или диатело.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно.

24. Способ по любому из пп. 1-23, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 375 мг один раз в 3 недели

25. Способ по любому из пп. 1-23, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 500 мг один раз в 4 недели.

26. Способ по любому из пп. 1-23, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 750 мг один раз в 4 недели.

По доверенности