

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041118**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.15

(21) Номер заявки
201890148

(22) Дата подачи заявки
2015.06.29

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)

(54) СПОСОБ ИНДУКЦИИ РАННЕГО ОТВЕТА Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНОЙ ИЗ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/EP2015/064746**

(87) **WO 2017/000983 2017.01.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОЗЕ ИММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС
(FR)**

(72) Изобретатель:
Костантини Доминик (FR)

(74) Представитель:
**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)**

(56) Epirimmune: "Vaccine Therapy in Treating Patients With Stage IIIB, Stage IV, or Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer", www.clinicaltrials.gov 5 November 2013 (2013-11-05), XP002755465, Retrieved from the Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00104780?term=NCT00104780&rank=1>, [retrieved on 2016-03-14], the whole document

BARVE MINAL ET AL.: "Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 26, no. 27, 20 September 2008 (2008-09-20), pages 4418-4425, XP009106492, ISSN: 0732-183X, DOI:10.1200/JCO.2008.16.6462 page 4419, column 1, paragraph 5 - column 2, paragraph 5; figure 4

(57) Изобретение относится к Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами для применения в лечении рака у HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2)-позитивного пациента, где указанное лечение включает период примирования, состоящий из двух-трех применений указанной Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, посредством этого индуцируя ответ центральных Т-клеток памяти.

B1**041118****041118****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности онкологии, и, более конкретно, настоящее изобретение относится к лечению рака.

Предшествующий уровень техники

Т-клетки памяти являются подгруппой антигенспецифических Т-клеток, которые сохраняются в течение долгого времени после того, как обнаруживают распознаваемый антиген и отвечают на него. Они быстро размножаются до больших количеств эффекторных Т-клеток при повторном воздействии распознанного антигена, таким образом обеспечивая иммунную систему "памятью" к прошлым инфекциям, а также раковым клеткам. При второй встрече с чужеродным агентом или раковыми клетками Т-клетки памяти могут инициировать более быстрый и сильный иммунный ответ, чем в первый раз. Т-клетки памяти включают два подтипа: центральные клетки памяти (ТСМ клетки) и эффекторные клетки памяти (ТЕМ клетки). Клетки памяти могут быть $CD4^+$ или $CD8^+$.

Недавно для некоторых видов рака было установлено, что высокая плотность эффекторных $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток памяти связано с более продолжительной общей выживаемостью (Fridman W. et al., 2012, Nat. Rev. Cancer, 12(4), 298-306). Однако, как кажется, центральные Т-клетки памяти обладают еще большей способностью к сохранению *in vivo*, а также являются более эффективными в обеспечении защитного иммунитета из-за их повышенной пролиферативной способности (Calarota S.A. et al., 2013, Clinical and Developmental Immunology, Article ID 637649).

Данные в литературе указывают, что исходная надлежащая активация $CD8^+$ Т-клеточного ответа пептидными вакцинами в адьюванте из минерального масла не гарантирует долговременной эффективности этих $CD8^+$ Т-клеток (Bijker M.S. et al., 2007, J. Immunol., 179:5033-5040), хотя такая долговременная эффективность представляет огромный интерес в области хронических заболеваний, таких как рак.

Bijker et al. описали специфическую стратегию, связанную с применением длинных пептидов для преодоления плохой долговременной эффективности противораковых вакцин. Однако ненадежность этой стратегии была продемонстрирована Karkada et al. (Karkada M. et al., 2014, Biologies: Target and Therapy, 8:27-38). Действительно, иммунный ответ на такие длинные пептиды был непостоянным в каждый момент времени и снижался после первой инъекции.

Таким образом, на сегодняшний день имеется настоятельная потребность в разработке способа лечения пептидной вакциной против рака, способной стимулировать Т-клетки памяти как можно раньше, особенно центральные Т-клетки памяти.

Классический режим применения противораковых вакцин на основе коротких пептидов состоит по меньшей мере из 5-6 введений вакцины. Holmes et al. определяют оптимальную схему применения специфической противораковой вакцины на основе коротких пептидов как 6 инъекций вакцины в каждый месяц лечения (Holmes J.P. et al., 2008, Cancer, 113, 1666-1675). В испытаниях 2 фазы субъекты рассматривались как эффективные участники протокола вакцинации, если они получали по меньшей мере 6 инъекций вакцины (Walter S. et al., 2012, Nature Medicine, 18, 1254-126). Другие считали эффективным лечением 7-10 введений вакцины на основе коротких пептидов (Kantoff P.W. et al., 2010, Cancer J. Clin. Oncol., 28:1099-1105; Schwartzentruber D.J. et al., 2011, N Engl. J. Med., 364:2119-27).

Эти введения вакцины на основе коротких пептидов могут быть болезненными для субъектов, и они не лишены побочных эффектов и токсичности. Кроме того, контроль за расходами на здравоохранение и оптимизация лечения рака являются ключевыми проблемами с учетом роста затрат. Таким образом, существует настоятельная потребность в поиске новых способов, обеспечивающих модификацию схемы применения вакцины для снижения числа инъекций при получении как можно более раннего вторичного иммунного Т-клеточного ответа.

Изложение сущности изобретения

Объект настоящего изобретения относится к новому режиму применения противораковой вакцины на основе коротких пептидов, обеспечивающему ранний вторичный иммунный ответ Т-клеток. В настоящем изобретении авторы неожиданно показали, что достаточно не более трех введений комбинации коротких пептидов для получения Т-специфического иммунного ответа посредством Т-клеток памяти, и этот ответ был связан с увеличением времени до прогрессирования опухоли (ВДП).

Настоящее изобретение относится к Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами для применения в лечении рака у HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2)-позитивного пациента, где Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими пептидами включает пептид aKX-VAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 10, где X и a соответственно указывают циклогексилаланин и d-аланин) и по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8 или 9 пептидов, выбранных из группы, состоящей из RLLQETELV (SEQ ID NO: 1), YLQLVFGIEV (SEQ ID NO: 2), LLTFWNPPV (SEQ ID NO: 3), KVFGLAFV (SEQ ID NO: 4), KLBPVQLWV (SEQ ID NO: 5), где В указывает α -аминоизомасляную кислоту; SMPPPGTRV (SEQ ID NO: 6), IMIGHLVGV (SEQ ID NO: 7), KVAEIVHFL (SEQ ID NO: 8) и YLSGADLNL (SEQ ID NO: 9), и где указанное лечение включает период примирования, состоящий из двух-трех применений указанной Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, таким образом индуцируя ответ центральных Т-клеток памяти.

В предпочтительном варианте осуществления Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими

пептидами является комбинацией из 10 пептидов (обозначаемой в настоящем документе как OSE-2101), включающей (или состоящей из) следующие пептиды:

RLLQETELV (SEQ ID NO: 1),

YLQLVFGIEV (SEQ ID NO: 2),

LLTFWNPPV (SEQ ID NO: 3),

KVFGSLAFV (SEQ ID NO: 4),

KLBPVQLWV (SEQ ID NO: 5), где В указывает α -аминоизомасляную кислоту,

SMPPPGTRV (SEQ ID NO: 6),

IMIGHLGV (SEQ ID NO: 7),

KVAEIVHFL (SEQ ID NO: 8),

YLSGADLNL (SEQ ID NO: 9),

aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 10), где X и a соответственно указывают циклогексилаланин и d-аланин.

В частности, указанное лечение включает период примирования, состоящий из 2-3 применений пептидной Т-специфической противораковой иммунотерапии, таким образом индуцируя ответ центральных Т-клеток памяти. Более предпочтительно лечение включает период примирования, состоящий из трех применений Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами. В частном варианте осуществления в период примирования Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами применяют каждые 1-4 недели, предпочтительно каждые 2-3 недели, более предпочтительно каждые 3 недели.

При необходимости, при лечении период примирования сопровождают поддерживающим периодом, во время которого применение Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами осуществляют каждые 2-8 месяцев, предпочтительно каждые 2-3 месяца, более предпочтительно каждые два месяца в течение одного года, а затем каждые три месяца в течение одного года.

Предпочтительно Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами проводят парентерально, предпочтительно подкожно.

Предпочтительно пептиды эмульгируют в неполном адьюванте Фрейнда или тому подобном, предпочтительно в Montanide ISA-51.

Предпочтительно дозировка пептидов составляет от 0,1 до 10 мг пептида на вводимую дозу. При необходимости, общая доза пептидов для каждого введения составляет 5,0 мг.

Предпочтительно рак является раком, выбранным из группы, состоящей из рака легкого, такого как НМКРЛ (немелкоклеточный рак легкого) и мелкоклеточный рак легкого, меланомы, мезотелиомы, рака молочной железы, первичных злокачественных опухолей головного мозга, рака яичников, рака матки, особенно рака тела матки и/или рака шейки матки, рака головы и шеи, рака толстой кишки или колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака почки, саркомы, герминогенных опухолей, лейкоза, лимфомы, рака яичка и рака мочевого пузыря; предпочтительно выбранным из группы, состоящей из НМКРЛ, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника и рака головы и/или шеи, более предпочтительно НМКРЛ.

Пациент является HLA-A2-позитивным пациентом. При необходимости, пациент страдает запущенным раком или раком на поздней стадии. При необходимости, пациент страдает метастазами, особенно метастазами в головном мозге. При необходимости, у пациента отмечается злокачественный плевральный выпот. При необходимости, пациент уже получал несколько линий лечения перед лечением Т-специфической иммунотерапией терапевтическими пептидами.

При необходимости, лечение применяют в комбинации с лечением другим противоопухолевым лекарством и/или радиотерапией, особенно ингибитором контрольных точек, предпочтительно ингибитором CTLA-4 и/или PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, BMS936559, MEDI4736, AMP-224, AMP-514, MPDL3280A и авелумаб; более конкретно, для трансформации пациентов с "неиммуногенной Т-памятью" в пациентов с "иммуногенной Т-памятью".

Подробное описание изобретения

Ранее только ответы ЦТЛ эффекторных клеток и ТХЛ эффекторных клеток были идентифицированы после применения оригинальной комбинации эпитопов коротких пептидов в качестве Т-клеточной специфической иммунотерапии в онкологии (EP 1620456 описывает химическую оптимизацию связывания с ключевыми рецепторами Т-клеточного ответа и оригинальную комбинацию эпитопов различной природы). Иммунный ответ как ЦТЛ (цитотоксических Т-лимфоцитов), так и ТХЛ (Т-хелперных лимфоцитов) против всех эпитопов был основан на эффекторных Т-клетках после инъекции такой комбинации эпитопов различной природы (фиксированных якорных, гетероклитических эпитопов и эпитопов дикого типа). Патент EP 1620456, описывающий иммунный ответ с такой оригинальной комбинацией, использовал стандартный Elispot анализ эффекторных Т-клеток без экспансии *in vitro* на HLA-A2 трансгенных моделях. Этот стандартный Elispot анализ обеспечил определение Т-клеток, способных к немедленной секреции интерферона- γ при антигенной/эпитопной стимуляции. Эти клетки представляют главным образом эффекторные Т-клетки.

Разделение Т-клеток памяти на различные подгруппы (эффекторные клетки памяти (TEM) и центральные клетки памяти (TCM)) изучали в нескольких исследованиях, оценивавших, какой тип клеток памяти способен обеспечить оптимальную защиту (Jennifer D. Bassett et al., 2012, *Molecular Therapy*, 20, 860-869).

Для стандартизации этих измерений два анализа ELISPOT позволяют выделить две главные популяции: стандартный ELISPOT анализ обеспечивает количественное определение эффекторных Т-клеток памяти, в то время как ELISPOT анализ с культивированием обеспечивает количественное определение размножаемых Т-клеток памяти, представляющих центральные Т-клетки памяти. Имеются доказательства, что иная популяция Т-клеток, более вероятно центральных Т-клеток памяти, дифференцирующихся в эффекторные Т-клетки во время периода культивирования, определяется посредством ELISPOT анализа с культивированием, по сравнению с измерением циркулирующих эффекторных Т-клеток памяти, которые количественно определяются стандартным ELISPOT (Calarotra S.A. et al., выше). Этот ELISPOT анализ с культивированием проводят путем культивирования лимфоцитов со специфическими антигенами в течение 10 суток, позволяя Т-клеткам размножаться в ответ на антиген. Затем применяют стандартную процедуру ELISPOT в ответ на соответствующие антигены, используемые для 10-дневного периода стимуляции, с измерением эффекторной функции.

Центральные Т-клетки памяти требуют повторной антигенной стимуляции для развития эффекторной функции. ELISPOT анализ с культивированием включает главным образом эти центральные Т-клетки памяти, поскольку истощение популяции центральных Т-клеток памяти полностью отменяет ответ в ELISPOT с культивированием (S.M. Todryk, et al., 2009, *Immunology*, 128, 83-91). Todryk et al. объясняют преобладающую роль центральных Т-клеток памяти в ELISPOT с культивированием, обеспечивающим CD4⁺ и CD8⁺ специфический ответ. Центральные Т-клетки памяти обладают большей способностью, чем эффекторные Т-клетки памяти, к выживанию *in vivo* и более эффективно опосредуют защитный иммунитет благодаря их повышенной пролиферативной способности.

Изобретение, описанное ниже, удовлетворяет имеющуюся потребность в онкологии, предоставляя оптимизированный режим применения и обеспечивая ранний ответ Т-клеток памяти в лечении рака, предпочтительно ранний ответ центральных Т-клеток памяти и, в частности, ранний долговременный ответ Т-клеток памяти.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к новому режиму применения терапии рака с помощью коротких пептидов, на основе многоэпитопной Т-специфической иммунотерапии рака. Неожиданно, авторы изобретения показали, что комбинация множества эпитопов коротких пептидов приводит к неожиданному сильному иммунному ответу с вовлечением Т-клеток долговременной памяти, в частности центральных Т-клеток памяти. Далее, авторы изобретения также установили, что очень короткий режим применения всего лишь с тремя инъекциями является достаточным для индукции этого сильного и долговременного ответа.

Соответственно, настоящее изобретение относится к Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как определено в настоящем документе, для применения в лечении рака у HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2)-позитивного пациента, где указанное лечение включает период примирования, состоящий из 2-3 применений указанной Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами. Оно также относится к способу лечения рака у HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2)-позитивного пациента, нуждающегося в этом, включающему период примирования, состоящий из 2-3 применений указанной Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами OSE2101, как определено в настоящем документе. Наконец, настоящее изобретение относится к применению Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами OSE2101, как определено в настоящем документе, для производства средства для лечения рака, где Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами применяют 2-3 раза во время периода примирования.

Определения

"Эпитоп" представляет собой совокупные особенности молекулы, такие как первичная, вторичная и третичная пептидная структура, и заряд, которые вместе образуют участок, распознаваемый иммуноглобулином, Т-клеточным рецептором или HLA молекулой. Альтернативно, эпитоп может быть определен как набор аминокислотных остатков, который вовлекается в распознавание конкретным иммуноглобулином, или в контексте Т-клеток, остатков, необходимых для распознавания белками Т-клеточного рецептора и/или рецепторами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Эпитопы присутствуют в природе и могут быть выделены, очищены или иным образом приготовлены или получены у человека. Например, эпитопы могут быть приготовлены путем выделения из натурального источника или они могут быть синтезированы в соответствии со стандартными протоколами в данной области техники. В настоящем описании эпитопы могут обозначаться в некоторых случаях как пептиды или пептидные эпитопы.

"Человеческий лейкоцитарный антиген" или "HLA" является белком I или II класса Главного комплекса гистосовместимости человека (см., например, Stites, et al., *IMMUNOLOGY*, 8th ED., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994)). Молекулы HLA группируют на основе разделяемых пептидсвязывающих специфичностей. Например, HLA-A2 является частным типом молекул HLA, которые разделяют

схожую аффинность связывания для пептидов, несущих определенные аминокислотные мотивы. Способы определения HLA-A2 статуса у пациента хорошо известны, и легко выполнимы (например, получение серологических образцов) для специалиста в данной области техники.

"Пептидный эпитоп" является пептидом, который включает аллель-специфический мотив или супермотив, позволяющий пептиду связываться с HLA молекулой и индуцировать ЦТЛ и/или ТХЛ ответ. Таким образом, пептидные эпитопы из настоящего изобретения способны к связыванию с подходящей молекулой HLA-A2, а затем к индукции ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) или ответа Т-хелперных лимфоцитов (ТХЛ) на пептид.

"Пептид PanDR" или пептид "PADRE®" является членом семейства молекул, которые связывают более одной молекулы HLA II класса. Характер, который определяет семейство молекул PADRE®, может быть обозначен как супермотив HLA II класса. Молекула PADRE® связывается с молекулами HLA II класса и стимулирует ТХЛ ответы человека *in vitro* и *in vivo*. Пептиды PADRE® описаны в патенте EP735893.

"Ответ ЦТЛ и/или ТХЛ" является защитным или терапевтическим иммунным ответом на антиген, полученный из патогенного антигена (например, антигена или инфекционного агента или опухолевого антигена), который некоторым образом предотвращает или по меньшей мере частично останавливает симптомы, побочные эффекты или прогрессирование заболевания. Иммунный ответ может также включать ответ антител, который облегчается посредством стимуляции хелперных Т-клеток.

Как применяется в настоящем документе, термин "Т-клетка памяти" включает как CCR7⁺ (эффекторные Т-клетки памяти), так и CCR7⁺ (центральные Т-клетки памяти) субпопуляции Т-клеток. Это определение также включает как класс II-рестриктированные CD4 Т-клетки памяти, так и класс I-рестриктированные CD8 Т-клетки памяти.

Стадии рака описывают тяжесть рака у индивидуума на основе размера и/или степени (достижения) исходной (первичной) опухоли и то, распространяется рак в организме или нет (метастазы). Стадии НМКРЛ нумеруются от 0 до IV. Стадии IIIb и IV являются наиболее запущенными стадиями.

"Общее состояние по шкале ECOG (Восточной объединенной онкологической группы)" применяется врачами и исследователями для оценки прогрессирования болезни пациента и для того, как болезнь влияет на повседневную жизнь пациента. Общее состояние по шкале ECOG оценивается от 0 до 5. Общее состояние 0 означает пациентов, которые полностью активны и способны осуществлять всю деятельность как до заболевания, без ограничения. Общее состояние 1 соответствует пациентам с ограничением активности, требующей усилий, но способным передвигаться и выполнять легкую или сидячую работу, например легкую домашнюю работу, канцелярскую работу.

Термин "общая выживаемость" (ОВ) означает продолжительность времени от даты начала лечения, в течение которого пациент жив. В клинических испытаниях измерение общей выживаемости является одним из способов оценки действия нового лечения.

Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими пептидами или пептидная вакцина.

Многоспецифическая Т-специфическая иммунотерапия рака из настоящего изобретения позволяет помочь иммунной системе развивать иммунную память, которая может обеспечивать долговременные опухоль-специфические эффекты.

Эффективная пептидная Т-специфическая иммунотерапия рака требует индукции широкого ряда ЦТЛ специфичностей. Этого лучше всего можно достичь с помощью оптимизированных эпитопов, нацеленных на множественные опухоль-ассоциированные антигены (ОАА), в виде комбинации множества эпитопов, нацеленной по меньшей мере на пять опухолевых антигенов и основанной на комбинации эпитопов. Предпочтительно по меньшей мере пять опухолевых антигенов включают или выбраны из HER2/neu, CEA, MAGE2, MAGE3 и p53.

Многоспецифическая Т-специфическая иммунотерапия рака включает комбинацию эпитопов, которые могут быть эпитопами дикого типа и модифицированными эпитопами (гетероклитическими и фиксированными якорными эпитопами). Предпочтительно многоспецифическая Т-специфическая иммунотерапия рака включает по меньшей мере пять эпитопов. В предпочтительном варианте осуществления комбинация эпитопов включает по меньшей мере пять эпитопов, выбранных среди тех, которые перечислены в табл. 6 заявки США US2014/01474790 (включенной в настоящий документ посредством ссылки). Более предпочтительно многоспецифическая Т-специфическая иммунотерапия рака включает по меньшей мере пять эпитопов, позволяющих нацеливаться на комбинацию из следующих пяти опухолевых антигенов: HER2/neu, CEA, MAGE2, MAGE3 и p53. Например, многоспецифическая Т-специфическая иммунотерапия рака может включать по меньшей мере 5, 6, 7, 8 или 9 эпитопов, выбранных среди тех, которые описаны в табл. 6 заявки США US2014/01474790.

Оригинальная комбинация, используемая в настоящем документе (OSE-2101), получена с помощью эпитопов дикого типа и модифицированных эпитопов (гетероклитических и фиксированных якорных эпитопов). Более подробную информацию по гетероклитическим и фиксированным якорным эпитопам можно найти, например, в патенте EP 1620456.

OSE-2101 представляет многоспецифическую Т-специфическую иммунотерапию рака, состоящую из

10 синтетических пептидов. Девять пептидов сконструированы для индукции ЦТЛ ответа против ОАА. В частности, Т-специфическая иммунотерапия предназначена для применения у пациентов для индукции ЦТЛ, направленных против карциноэмбрионального антигена (СЕА), р53, человеческого эпидермального рецептора-2/неврологического (HER-2/neu) и антигена меланомы 2 и 3 (MAGE-2/3). Эти ОАА были выбраны на основе эпидемиологии, поскольку они часто сверхэкспрессируются в различных распространенных злокачественных образованиях, таких как рак толстой кишки, рак яичника, рак молочной железы и НМКРЛ. Каждый эпитоп ЦТЛ ограничен суперсемейством HLA-A2 молекул I класса главного комплекса гистосовместимости, таким образом, обеспечивая охват примерно 45% от общей популяции. Десятый синтетический пептид является рап-DR эпитопом (PADRE), рационально сконструированным эпитопом хелперного Т-лимфоцита (ТХЛ), включенным только для повышения амплитуды ЦТЛ ответа.

Композиция OSE-2101 включает или состоит из следующих пептидов:

RLLQETELV (SEQ ID NO: 1),

YLQLVFGIEV (SEQ ID NO: 2),

LLTFWNPPV (SEQ ID NO: 3),

KVFGSLAFV (SEQ ID NO: 4),

KLBPVQLWV (SEQ ID NO: 5), где В указывает α -аминоизомасляную кислоту;

SMPPPGTRV (SEQ ID NO: 6),

IMIGHLVGV (SEQ ID NO: 7),

KVAEIVHFL (SEQ ID NO: 8),

YLSGADLNL (SEQ ID NO: 9),

aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 10), где X и a соответственно указывают циклогексилаланин и d-аланин.

Таким образом, Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими пептидами включает пептид aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 10, где X и a соответственно указывают циклогексилаланин и d-аланин), и по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8 или 9 пептидов, выбранных из группы, состоящей из:

RLLQETELV (SEQ ID NO: 1),

YLQLVFGIEV (SEQ ID NO: 2),

LLTFWNPPV (SEQ ID NO: 3),

KVFGSLAFV (SEQ ID NO: 4),

KLBPVQLWV (SEQ ID NO: 5), где В указывает α -аминоизомасляную кислоту;

SMPPPGTRV (SEQ ID NO: 6),

IMIGHLVGV (SEQ ID NO: 7),

KVAEIVHFL (SEQ ID NO: 8),

YLSGADLNL (SEQ ID NO: 9).

Пептиды могут быть синтезированы с применением стандартной Вос или Fmoc химии для твердофазного синтеза пептидов, начиная от подходящей смолы, и очищены с помощью стандартных способов. Альтернативно, пептид может быть получен посредством генной инженерии с рекомбинантными клетками или с помощью РНК, например посредством системы трансляции *in vitro*.

Многэпитопная композиция для Т-специфической иммунотерапии рака может включать фармацевтически пригодный носитель или наполнитель. Более предпочтительно фармацевтически пригодный носитель является водным носителем, особенно буфером. В частности, она может включать один или несколько адъювантов. Например, адъюванты могут быть неполным адъювантом Фрейнда, адъювантом из минерального масла, гидроксидом алюминия или квасцами, ГМ-КСФ. Другие подходящие адъюванты хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления многэпитопная Т-специфическая иммунотерапия рака может включать активированные пептидами антиген-презентирующие клетки, такие как дендритные клетки.

Предпочтительно в многэпитопной Т-специфической иммунотерапии рака пептиды эмульгированы в неполном адъюванте Фрейнда или тому подобном. В предпочтительном варианте осуществления адъювант является адъювантом из минерального масла, подобным неполному адъюванту Фрейнда, производимому и поставляемому Seppic SA, Париж, Франция. В наиболее предпочтительном варианте осуществления адъювантом является Montanide® ISA 51.

Каждый пептид из композиции может присутствовать в концентрации от 0,1 до 1 мг/мл, предпочтительно 0,5 мг/мл. Предпочтительно все пептиды присутствуют в композиции в одной и той же концентрации.

Предпочтительно многэпитопная композиция для Т-специфической иммунотерапии рака является стерильной, не содержащей консервантов эмульсией из 10 пептидов в концентрации 0,5 мг/мл каждый, эмульгированной в адъюванте Montanide® ISA 51 в отношении 1:1 (по массе) и расфасованной в стеклянные флаконы, закупоренные резиновыми пробками, и хранящейся при 2-8°C.

OSE-2101 производится в асептических условиях. Пептиды растворяют в трех различных растворителях, подвергают стерилизующей фильтрации, объединяют в пул, а затем эмульгируют в адъюванте при гомогенизации в контролируемых условиях. Анализ продукта перед выпуском включает анализ внешне-

го вида, содержания эндотоксина, стерильности, вязкости, размера частиц, концентрации каждого из пептидов, объема, pH и активности. Приготовление композиции OSE-2101 подробно описано в WO 2004/094454, фиг. 3А и с. 105, 106, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

При необходимости, в дополнение к 10 пептидам из OSE -2101, пептидная композиция из настоящего изобретения может дополнительно включать дополнительные пептиды, в частности пептидные эпитопы, используемые для индукции ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и таргетинга ОАА. Например, пептидная композиция из настоящего изобретения может дополнительно включать пептид, раскрытый в WO 2009/143843 (описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), и более конкретно IDO5 (SEQ ID NO: № 11).

Режим применения Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами.

Режим применения вакцины включает период примирования и, при необходимости, поддерживающий период.

Термин "период примирования" означает период процесса вакцинации, во время которого индуцируют ответ центральных Т-клеток памяти против одного или нескольких пептидов из Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами.

Термин "поддерживающий период" или "усиливающий период" означает период процесса вакцинации после периода примирования, во время которого применяют ту же самую Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами, и иммунный ответ Т-клеток памяти продлевается или усиливается.

В соответствии с предпочтительным аспектом настоящего изобретения период примирования субъекта, получающего лечение Т-специфической иммунотерапией терапевтическими пептидами, составляет одно-три применения Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами или вакцины.

В еще более предпочтительном варианте осуществления период примирования составляет три применения Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами или вакцины.

Во время этого периода примирования Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами применяют каждые одну-четыре недели, предпочтительно каждые две-три недели, более предпочтительно каждые три недели.

Период примирования является эффективным для индукции ответа центральных Т-клеток памяти против одного или нескольких пептидов из Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, предпочтительно против по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 пептидов из Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами.

Во время необязательного поддерживающего периода, который следует после периода примирования, осуществляют одно или несколько применений Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами или вакцины. Во время этого поддерживающего периода применение вакцины осуществляют каждые два-восемь месяцев, предпочтительно каждые два-три месяца, например каждые два месяца в течение одного или двух лет, а затем каждые три месяца в течение одного или двух лет.

В альтернативном варианте осуществления период примирования не сопровождается поддерживающим периодом.

Период примирования и поддерживающий период могут быть разделены периодом покоя, который не включает какое-либо применение Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами. Этот период покоя может занимать четыре-двенадцать недель.

В другом альтернативном варианте осуществления период примирования сопровождается лечением ингибитором контрольных точек, поскольку Т-клетки памяти, индуцированные Т-специфической иммунотерапией терапевтическими пептидами, обеспечивают иммуногенность опухолевого окружения.

Настоящее изобретение далее относится к способу лечения рака у HLA-A2-позитивного пациента, включающему применение терапевтически эффективного количества Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как описано в настоящем документе, где указанное лечение включает период примирования, во время которого осуществляют одно-три применения указанной пептидной вакцины. Способ может дополнительно включать предварительный этап определения HLA статуса у пациента, выбора HLA-A2-позитивных пациентов и применения терапевтически эффективного количества Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе, у HLA-A2-позитивных пациентов. Способ может дополнительно включать поддерживающий период, как описано выше. Предпочтительно Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими пептидами представляет OSE2101.

Дозировка.

В контексте настоящего изобретения термин "лечение" означает радикальное, симптоматическое и профилактическое лечение. Фармацевтические композиции и препараты из изобретения можно применять у людей с имеющимся раком или опухолью, предпочтительно на поздних стадиях прогрессирования рака. Фармацевтические композиции и препараты из изобретения необязательно будут излечивать пациента, страдающего раком, но будут замедлять или продлевать прогрессирование или предотвращать дальнейшее прогрессирование заболевания, таким образом облегчая состояние пациента. В частности, фар-

мацевтические композиции и препараты из изобретения уменьшают развитие опухолей и/или предотвращают появление или развитие метастазов и рецидив рака. При лечении рака фармацевтическую композицию из изобретения применяют в терапевтически эффективном количестве.

"Эффективное количество" означает количество фармацевтической композиции из изобретения, которое предотвращает, устраняет или уменьшает вредные эффекты метастазов в головном мозге. Необходимо понять, что применяемая доза может быть приспособлена специалистом в данной области техники в соответствии с пациентом, патологией, способом применения и т.д. Дозировка и режим зависят от стадии и тяжести заболевания, подвергаемого лечению, массы тела и общего состояния здоровья пациента и решения врача, назначающего лечение. Более конкретно, "терапевтически эффективное количество Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе", означает количество, достаточное для повышения общей выживаемости пациента. В частности, "терапевтически эффективное количество Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе", означает количество, достаточное для индукции ответа центральных Т-клеток памяти на один или несколько пептидов из Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами.

В предыдущих испытаниях при раке анализировали повышающиеся дозы пептидов в диапазоне от 0,1 до 10 мг пептида на вводимую дозу, эмульгированных в неполном адъюванте Фрейнда. Для всех анализируемых доз лечение пептидом/неполным адъювантом Фрейнда было безопасным и хорошо переносилось, без тяжелых дозозависимых проявлений системной токсичности.

Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе, можно применять любым подходящим способом, в частности парентеральным путем, таким как подкожное, интрадермальное или внутримышечное введение, или посредством аэрозольного, трансмукозального, интраплеврального или интратекального способа. В наиболее предпочтительном варианте осуществления пептидную композицию вводят подкожно. Предпочтительно Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе, предназначена для подкожного введения.

Предпочтительно дозы пептида находятся в диапазоне от 0,1 до 10 мг пептида на вводимую дозу. В предпочтительном варианте осуществления общая доза пептидов на каждую инъекцию или применение составляет 5,0 мг (1 мл лекарственного продукта, содержащего 0,5 мг каждого пептида).

Рак.

В соответствии с предпочтительным аспектом настоящего изобретения субъекты вакцинации композицией OSE-2101 являются пациентами, страдающими раком. В предпочтительном варианте осуществления рак у пациента является одним из следующих заболеваний: рак легкого, такой как НМКРЛ (немелкоклеточный рак легкого) и мелкоклеточный рак легкого, меланома, мезотелиома, рак молочной железы, первичные злокачественные опухоли головного мозга, рак яичника, рак матки, особенно рак тела матки и/или рак шейки матки, рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, саркома, герминогенные опухоли, лейкоз, лимфома, рак яичка и рак мочевого пузыря; предпочтительно является НМКРЛ, раком толстой кишки, раком молочной железы, раком яичника и раком головы и/или шеи, более предпочтительно НМКРЛ.

В другом предпочтительном варианте осуществления рак у пациента является запущенным раком. Термин "запущенный рак" означает рак на поздней стадии развития, т.е. рак, распространившийся в организме (метастазы). Предпочтительно пациент страдает метастазами в головном мозге.

Альтернативно, у пациента имеется злокачественный плевральный выпот, предпочтительно метастатический плевральный выпот, в частности, ассоциированный с раком легкого, раком молочной железы, лимфомой или лейкозом.

При необходимости, пациент уже получал несколько линий лечения перед вакцинацией пептидной композицией. В частном варианте осуществления пациент имеет положительный ТХЛ ответ.

Комбинация с другим противоопухолевым лекарством.

При необходимости лечение проводят в комбинации с лечением другим противоопухолевым средством, в частности с химиотерапией, гормонотерапией и/или иммунотерапией.

Например, химиотерапия может быть выбрана из цисплатина, карбоплатина, циклофосфида, этопозида, тенипозида, митомицина, иринотекана, винорелбина, этопозида, ифосфида, темозоломида, фторурацила (5FU), доцетаксела, пеметрекседа, навелбина; лекарств, нацеленных на рост кровеносных сосудов опухоли (ФРЭС), таких как бевацизумаб, рамцизумаб; преднизона; ингибиторов тирозинкиназы, нацеленных на РЭФР (рецептор эпидермального фактора роста), таких как gefitinib, erlotinib, afatinib; ингибиторов киназы апластической лимфомы, таких как цирозитиниб; церитиниба, и любой их комбинации.

В предпочтительном варианте осуществления лечение вакциной из настоящего изобретения применяют в комбинации с ингибитором контрольных точек, особенно CTLA-4 ингибитором и/или PD-1 или PD-L1 ингибитором; IDO ингибиторами. Лечение ингибитором контрольных точек может быть проведено до, одновременно или после лечения Т-специфической иммунотерапией терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе, в частности, в период примирования лечения.

Настоящее изобретение относится к набору или продукту, включающему (а) терапевтически эффективное количество Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе; и (b) ингибитор контрольных точек, предпочтительно CTLA-4 ингибитор и/или PD-1 или PD-L1 ингибитор, в качестве комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения, в частности, в лечении рака.

Предпочтительно Т-специфическая иммунотерапия терапевтическими пептидами представляет OSE-2101.

В предпочтительном варианте осуществления лечение ингибитором контрольных точек осуществляют после периода примирования лечения терапевтически эффективным количеством Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами, как раскрыто в настоящем документе.

Некоторые PD-1/PD-L1 ингибиторы уже доступны или находятся в клинической разработке. Например, PD-1/PD-L1 ингибиторы могут быть выбраны из не исчерпывающего перечня, включающего пембролизумаб (Merk), ниволумаб (Bristol Myers Squibb), пидилизумаб (Cure Tech), BMS936559 (Bristol Myers Squibb), MEDI4736 (Astra Zeneca), AMP-224 (Astra Zeneca), AMP-514 (Astra Zeneca), MPDL3280A (Roche), авелумаб (также известный, как MSB0010718C от Merck KgASerono /Pfizer). Например, PD-1/PD-L1 ингибиторы могут быть выбраны из тех, которые раскрыты в WO 2013/079174.

Например, CTLA-4 ингибиторы могут быть выбраны из не исчерпывающего перечня, включающего тремелиумаб (Pfizer Medimmune) и ипилимумаб (BMS).

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения будут раскрыты в следующем разделе, посвященном экспериментам, которые должны рассматриваться как иллюстративные и не ограничивающие объем настоящего изобретения.

Описание фигур

Фиг. 1 - амплитуда ответов центральных Т-клеток памяти, индуцированных OSE2101, на 9 и 18 неделе клинических испытаний 1/2 фазы.

Фиг. 2 - ответы центральных Т-клеток памяти на некоторые эпитопы, индуцированные посредством ряда доз OSE2101 в клинических испытаниях 2 фазы.

Фиг. 3 - корреляция OSE-2101-индуцированных PADRE ТХЛ ответов и ответов ЦТЛ/центральных Т-клеток памяти.

Фиг. 4 - расчет по методу Каплана-Мейера.

Примеры

Пример 1. Ранний иммунный ответ посредством вовлечения центральных Т-клеток памяти.

Во время клинических испытаний 1/2 фазы изучали безопасность и иммуногенность 10-пептидной усиленной эпитопной комбинации, OSE-2101, рационально сконструированной для индукции широких многоэпитопных ответов ЦТЛ у пациентов на ранней стадии рака толстой кишки и НМКРЛ. В дополнение к охвату множества эпитопов, OSE-2101 также нацеливается на эпитопы от пяти опухолевых антигенов, которые широко распространены в опухолях молочной железы, толстой кишки, немелкоклеточного рака легких, опухолях яичника (CEA, HER-2/neu, p53, MAGE2 и MAGE3), что делает этот продукт пригодным для лечения по различным онкологическим показаниям. В качестве источника Т-хелперных клеток для индукции ЦТЛ был включен универсальный ТХЛ эпитоп Pan DR эпитоп, и применяли адъювант из минерального масла для готовой композиции для этой Т-специфической иммунотерапии рака.

Критерии отбора пациентов.

OSE-2101 тестировали в двух клинических испытаниях I фазы для конкретных заболеваний, включающих HLA-A2⁺ пациентов с гистологически подтвержденной IIВ/IIА стадией НМКРЛ или III стадией рака толстой кишки. Все пациенты были диагностированы как не имеющие признаков заболевания в течение последних 6 месяцев после проведения стандартной терапии. У пациентов отмечены нормальные лабораторные параметры биохимического анализа крови и число лейкоцитов, и у них было оценено общее состояние по шкале Восточной объединенной онкологической группы как 0 или 1. Их исключали из исследования в случае лечения иммуномодулирующими агентами в течение одного месяца от включения в исследование или другими иммунотерапиями против рака. Пациенты с наличием в анамнезе других раков, за исключением базальной или плоскоклеточной карциномы кожи или рака шейки матки in situ, были также исключены как пациенты с сопутствующими острыми патологическими состояниями или определенными аутоиммунными заболеваниями.

Пептиды.

Иммуногенность всех эпитопов иммунного мониторинга подтверждали путем стимуляции ЦТЛ, индуцированных посредством лечения LA-A2.1/K^b трансгенных мышей доклинической серией OSE-2101 (стандартный Elispot анализ).

Дизайн клинического исследования.

Оба испытания были построены как испытания 1/2 фазы, открытые, многоцентровые исследования с однократным введением, с множеством применений, для оценки безопасности и иммуногенности OSE-2101 иммунотерапии. Пациентов лечили 1 мл OSE-2101 каждые три недели с введением в целом шести доз. Каждую дозу вводили подкожно в одной и той же области в дельтовидную мышцу или верхнюю часть бедра или на противоположной стороне, если отмечались местные побочные реакции. Про-

должительность исследования для каждого пациента, завершившего испытание, составила 18 недель. Клинические ответы или выживаемость пациентов не оценивали в испытаниях $1/2$ фазы.

Обработка клинических образцов.

Кровь или продукт лейкофереза получали от пациентов до лечения, на 9 или 18 неделе, спустя 3 недели после третьей и шестой дозы OSE-2101 соответственно. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНКПК) выделяли из образцов в течение 24 ч после сбора с применением градиента плотности Ficoll-Paque и подвергали криоконсервации в контейнерах, сконструированных для обеспечения оптимального замораживания (Mr. Frosty, Nalgene). Для применения клетки быстро размораживали при 37°C, затем переносили в среду, содержащую человеческую АВ сыворотку, для обработки.

Измерение ответа центральных Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток памяти.

ЦТЛ ответы у 16 пациентов (10 больных раком толстой кишки и 6 больных НМКРЛ) контролировали против каждого эпитопа и против эпитопов или аналогов эпитопов дикого типа. Для каждого пациента тестировали образцы до лечения, на 9 неделе, на 18 неделе в одном и том же эксперименте, для сравнения ответа до и после лечения. Ответ центральных Т-клеток памяти определяли с применением метода иммуноферментных пятен для ИФН- γ (анализа ELISPOT с культивированием) после *in vitro* стимуляции МНКПК в течение 10 дней с каждым эпитопом вакцины. Вкратце, МНКПК для каждого момента времени стимулировали на 0 день 10 мкг/мл каждого эпитопа по отдельности в параллельных опытах на 48-луночных планшетах для культивирования (2×10^6 МНКПК/лунку). Во все культуры добавляли рИЛ-2 (Endogen, Уоберн, Массачусетс; итоговая концентрация 10 Ед./мл) на 1, 4 и 7 дни. Спустя 10 дней после начала культивирования клетки собирали и тестировали активности против специфических пептидов вакцины и соответствующих пептидов аналогов вакцины дикого типа в анализе ELISPOT Т-клеток памяти. Клетки тестировали на 96-луночных планшетах Millipore IP, предварительно покрытых мышиными антителами к человеческому ИФН- γ (Mabtech USA, Цинциннати, Огайо). 5×10^4 клеток и $1,25 \times 10^4$ клеток из каждой культуры помещали в трех повторностях в лунки с 10^5 облученных аутологических МНКПК с 10 мкг/мл пептида. В качестве контроля ЦТЛ также тестировали против нерелевантного HLA-A2.1-связывающего HBV пептида. Спустя 20 ч инкубации планшеты ELISPOT анализа Т-памяти проявляли, выполняя последовательные инкубации с биотинилированным антителом к ИФН- γ человека (Mabtech, США), комплексом авидин-пероксидаза (APC, Vector Laboratories, Берлингем, Калифорния), субстратом 3-амино-9-этилкарбазолом (АЭК) (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Клетки, образующие пятна (SFC), пересчитывали с применением компьютеризованной системы анализа изображений (Zeiss KS ELISPOT Reader, Carl Zeiss MicroImaging, Торнвуд, Нью-Йорк). Данные регистрировали в виде общего числа SFC на 5×10^4 клеток после вычитания пятен, индуцированных нерелевантным HBV пептидом.

ELISPOT анализ с культивированием для центральных Т-клеток памяти квалифицировали с применением HLA-A2⁺ МНКПК от пациентов, у которых отмечалось восстановление ответа Т-эффекторных клеток памяти против EBV BMLF1 ЦТЛ эпитопа (последовательность GLCTLVAML) при идентичных условиях стимуляции, использованных для анализа клинических образцов. Специфический ответ, генерируемый этими донорами, титровали как лимитирующие клеточные дозы и оценивали линейный ответ (коэффициент корреляции = 0,99). Нижний предел детекции анализа при определении составил 5 SFC/лунку, а верхний предел - 600 SFC. Интерэкспериментальную воспроизводимость оценивали путем повторного анализа криоконсервированных образцов МНКПК до вакцинации от позитивных доноров в отдельные дни, а коэффициент вариации (КВ) находился в диапазоне 7-12% в этих анализах. Для оценки воспроизводимости при проведении анализа двумя лаборантами два оператора тестировали МНКПК до лечения от одного и того же пациента в разные дни, и КВ составил 13-16% при оптимальной дозе клеток. Значения КВ признаны находящимися в приемлемом диапазоне вариабельности и решительно поддерживают применение проводимого анализа для определения клинического иммунного ответа.

Критерии ответа.

Позитивные критерии ответа были установлены перспективно после анализа вариабельности ответов до лечения против каждого эпитопа и нерелевантного HBV контрольного эпитопа. Средний SFC ответ в образце до лечения считали позитивным эпитоп-индуцированным ответом Т-клеток памяти, если выполнялись все следующие условия:

- (1) ответ был больше 5 SFC от ответа на нерелевантный эпитоп;
- (2) был больше среднего значения SFC ответа на нерелевантный эпитоп, плюс 2 СКО;
- (3) был в два раза больше, чем ответ SFC в образце до лечения от того же самого пациента, плюс 2 СКО.

Включение "плюс два среднеквадратических отклонения" использовали для регуляции вариабельности анализа, и это служило для обеспечения более жестких критериев.

Результаты.

Характеристика пациентов. 14 пациентов, больных раком толстой кишки III стадии, участвовали в испытании, и 10 пациентов завершили испытание после приема шести доз OSE-2101. В испытании НМКРЛ участвовали 10 пациентов с IIB/IIIA стадией заболевания, и 6 пациентов завершили

исследование.

OSE-2101 был безопасным и переносился пациентами в двух клинических испытаниях с типичными наблюдаемыми побочными эффектами, обычными для пептидов, приготовленных в адьюванте из минерального масла.

Иммуногенность OSE-2101. В целом у 16 пациентов (10 больных раком толстой кишки и 6 больных НМКРЛ), получавших полный курс из шести доз OSE-2101, оценивали частоту, ширину и амплитуду ОАА-специфического ответа центральных Т-клеток памяти, индуцированного специфической иммунотерапией. Для улучшения детекции ответов центральных Т-клеток памяти МНКПК стимулировали *in vitro* в течение 10 суток, каждый, эпитопом. Эффекторную активность МНКПК, размноженных *in vitro*, определяли с ELISPOT анализом ИФН- γ против соответствующего эпитопа и нерелевантного HLA-A*0201-связывающего HBV эпитопа. Если эпитоп был аналогом, также тестировали соответствующий эпитоп дикого типа.

Результаты иммунного мониторинга 16 пациентов показали, что OSE-2101 был способен к индукции широкого ряда ответов центральных Т-клеток памяти у пациентов. В испытаниях у больных раком толстой кишки 8 из 10 пациентов неожиданно генерировали ЦТЛ ответы против четырех или больше эпитопов вакцины в моменты времени на 9 и 18 неделе (фиг. 1). Средняя амплитуда ELISPOT с культивированием была в том же самом диапазоне от 9 до 18 недели.

Пациент 607 продемонстрировал наиболее широкую и высокую амплитуду ответов центральных Т-клеток памяти, проявляя ответы 60-200 SFC на 5×10^4 клеток против семи эпитопов на 9 неделе. Более важно, что пять из семи индуцированных ответов Т-клеток памяти у этого пациента были направлены против эпитопов дикого типа. На 18 неделе у пациента 607 генерировались ответы центральных Т-клеток памяти, некоторые из них превышали 1000 SFC, против шести тех же самых эпитопов, как на 9 неделе.

В равной степени заслуживает внимания, что многоэпитопные ответы наблюдались у больных раком толстой кишки 601, 603, 604 и 606 на пять или более эпитопов, неожиданного на 9 неделе и/или также на 18 неделе.

Многоэпитопные ответы центральных Т-клеток памяти также наблюдались у больных НМКРЛ, неожиданно на 9 неделе и/или также на 18 неделе. Для всех описанных данных применяется протокол анализа, где образцы МНКПК культивировали *in vitro* в течение 10 суток с индивидуальными эпитопами OSE-2101 для размножения *in vivo*-примированных ЦТЛ перед анализом ELISPOT и для измерения ответа центральных Т-клеток памяти; а этап стимуляции *in vitro*, как при ELISPOT с культивированием, был необходим, чтобы видеть ответы на эпитопы.

Иммуногенность различных классов эпитопов. Анализ частоты и амплитуды ЦТЛ ответов показал, что большинство эпитопов и все классы эпитопов, представленные в продукте, были иммуногенными у пациентов. В целом, восемь из девяти эпитопов вакцины индуцировали ответы центральных Т-клеток памяти по меньшей мере у одного больного раком толстой кишки, а шесть эпитопов вакцины были иммуногенными по меньшей мере у одного больного НМКРЛ. Три из фиксированных якорных аналогов (CEA.24V9 (SEQ ID NO: 3), HER2.369V2V9 (SEQ ID NO: 4) и p53.139L2B3 (SEQ ID NO: 5)) и два гетероклитических аналога (CEA.691H5 (SEQ ID NO: 7) и CEA.605D6 (SEQ ID NO: 9)) были особенно иммуногенными, поскольку 60-80% пациентов с раком толстой кишки и 40-80% HLA-A*0201-типированных пациентов с НМКРЛ отвечали на каждый из аналогов (табл. 1A и 1B, ответы на 9 или 18 неделе). Повышенная иммуногенность аналогов была также продемонстрирована средними амплитудами ответов в диапазоне 70-180 SFC на 9 неделе и 90-315 SFC на 18 неделе у больных раком толстой кишки (табл. 1A), и 60-138 SFC на 18 неделе у больных НМКРЛ (табл. 1B).

Иммунологический анализ 16 больных раком толстой кишки и НМКРЛ, завершивших лечение, показал, что OSE-2101 успешно индуцировал широкий ряд ответов ЦТЛ и Т-клеток памяти у отдельных пациентов спустя всего 3 инъекции, характеризующихся одновременной индукцией ЦТЛ специфичностей, направленных против некоторых эпитопов. Широкий ряд ответов ЦТЛ/центральных Т-клеток памяти, наблюдавшихся у отдельных пациентов в обеих группах, показал потенциальную долговременную эффективность иммунотерапии у пациентов на ранних и поздних стадиях. Вместо этого одновременные ответы ЦТЛ и центральных Т-клеток памяти направлены на долговременную клиническую пользу многоэпитопного подхода к иммунотерапии рака.

Таблица 1А

Суммарные данные по ответам ЦТЛ у 10 больных раком толстой кишки

Пациент	Образец	CEA.24V9		CEA.605D6		CEA.691H5		HER2.369L2V9		MAGE2.157	MAGE3.112I5		p53.139L2B3		p53.149M2		№ позитивных эпителий			
		A ^{а)}	WT ^{б)}	A	WT	A	WT	A	WT	WT	A	WT	A	WT	A	WT	Вакцина	WT ^{в)}		
551	До вакцин	9.3 ^{с)}	18.6	15.6	0.8	0.0	0.0	28.7	1.8	1.3	1.0	1.7	13.5	12.8	0.0	2.7	3	1		
	9 неделя	42.7 ^{д)}	-	-	-	92.7	-	134.7	119.7	-	-	-	-	-	-	4			3	
	18 неделя	-	-	-	-	68.7	-	80.7	22.7	45.7	8.7	7.7	-	-	-	-				
601	До вакцин	0.0	0.5	0.0	3.0	0.0	1.3	0.0	0.7	0.0	0.0	1.0	0.3	2.8	0.0	0.0	6	3		
	9 неделя	118.0	92.3	88.3	74.3	417.3	-	112.7	102.0	-	27.0	-	129.0	-	-	6			3	
	18 неделя	96.0	55.0	-	-	133.7	-	52.3	55.7	-	-	-	96.0	-	-	-			2	
602	До вакцин	0.0	0.0	8.5	3.8	0.0	1.0	0.0	3.3	0.0	2.0	1.5	0.0	0.0	0.5	1.0	0	0		
	9 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1			0	
	18 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.7	-	-	-				
603	До вакцин	0.0	0.5	6.0	1.0	0.0	0.7	6.3	0.0	0.3	3.5	1.8	6.0	0.8	1.0	0.0	6	4		
	9 неделя	63.0	60.3	114.7	101.0	32.7	-	30.0	26.3	320.0	-	-	85.3	-	-	3			3	
	18 неделя	20.7	32.7	-	-	8.0	-	-	11.3	-	16.0	12.3	-	-	-	-				
604	До вакцин	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	4.5	6	4		
	9 неделя	55.3	75.0	70.0	62.3	109.3	-	88.3	68.3	-	60.3	43.7	41.0	-	-	6			2	
	18 неделя	187.0	161.3	413.3	-	397.3	-	314.7	220.0	-	268.0	-	188.7	-	-	-				
605	До вакцин	0.0	3.9	0.0	0.0	5.0	13.7	0.0	0.0	20.3	0.0	0.0	1.0	1.8	0.0	9.3	4	2		
	9 неделя	43.7	30.0	-	-	65.7	-	32.7	35.0	-	-	-	9.7	-	-	3			1	
	18 неделя	109.7	129.7	-	-	-	-	33.7	-	-	-	-	44.7	-	-	-				
606	До вакцин	3.0	1.3	5.2	0.0	2.0	1.2	3.7	5.7	3.7	0.7	1.7	0.0	0.3	0.0	1.0	2	0		
	9 неделя	-	-	-	-	24.3	-	-	-	-	-	-	43.7	-	-	5			2	
	18 неделя	-	-	-	-	45.0	-	71.0	38.3	24.7	18.7	-	37.7	-	-	-				
607	До вакцин	4.2	1.7	2.7	0.0	0.0	0.0	3.3	2.2	0.7	4.3	0.0	4.2	0.7	1.0	0.0	7	5		
	9 неделя	198.7	185.7	72.7	30.3	593.3	-	389.3	178.7	172.0	60.3	23.0	114.3	-	-	6			4	
	18 неделя	586.7	426.7	414.7	372.0	1648.0	-	1642.7	1658.7	1184.0	-	-	146.7	-	-	-				
608	До вакцин	8.5	0.0	4.3	0.0	3.7	0.5	0.0	2.0	1.8	2.7	0.0	24.0	2.8	2.0	2.3	1	1		
	9 неделя	-	-	-	6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.0	-			1	0
	18 неделя	-	-	-	-	18.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
609	До вакцин	3.7	4.5	6.2	0.5	0.0	0.0	1.5	2.0	6.8	1.7	1.0	35.8	0.0	0.0	4.2	3	3		
	9 неделя	-	28.3	75.3	100.7	89.0	-	58.0	24.7	-	-	-	-	-	-	4			3	
	18 неделя	31.7	29.0	22.0	17.0	86.0	-	14.7	9.3	-	-	-	-	-	-	-				
Среднее SFC	9 неделя	86.6	75.3	84.2	62.5	178.0	-	120.8	78.7	246.0	49.2	33.3	70.5	-	18.0	-				
	18 неделя	172.0	139.1	283.3	194.5	300.6	-	315.7	288.0	418.1	77.8	10.0	89.4	-	-	-				

а) А, ЦТЛ тестировали против аналога вакцины.

б) WT, ЦТЛ тестировали против эпитопа вакцины дикого типа, соответствующего аналогу вакцины.

с) Значения указывают суммарные показатели SFC до вакцинации на 50,000 клеток, тестированные против указанного эпитопа.

д) Значения указывают суммарные показатели SFC на 50,000 клеток для позитивных ответов на вакцину.

е) Указывает SFC ответ, не соответствующий критериям, и ответ на вакцину был негативным.

ф) Общее число позитивного ответа на вакцину против эпитопа вакцины дикого типа или эпитопа дикого типа, соответствующего аналогу вакцины.

Таблица 1В

Суммарные данные ЦТЛ ответов у 6 больных НМКРЛ

Пациент	Образец	CEA.24V9		CEA.605D6		CEA.691H5		HER2.369L2V9		MAGE2.157		MAGE3.112I5		p53.139L2B3		p53.149M2		№ позитивных эпителиев	
		A ^{а)}	WT ^{б)}	A	WT	A	WT	A	WT	WT	A	WT	A	WT	A	WT	Вакцина	WT	
201	До вакцин	0.0 ^{с)}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.7	22.8	51.5	0.0	0.0	16.5	16.5	0	0	
	9 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	18 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
502	До вакцин	0.0	0.0	0.0	9.3	4.2	4.0	4.7	2.2	0.7	3.5	2.5	0.0	0.0	5.7	6.2	1	1	
	9 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	9.3	-	-	-	-	-	-			
	18 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
504	До вакцин	0.0	0.0	3.3	0.3	0.0	0.5	1.7	1.0	1.7	1.8	0.3	1.3	1.8	1.8	0.8	5	2	
	9 неделя	-	-	20.7	-	42.7	-	84.3	71.0	50.7	-	-	18.7	-	-	-			
	18 неделя	25.3 ^{д)}	23.3	214.3	15.7	284.0	-	284.0	155.7	124.7	-	-	90.3	-	-	-			
505	До вакцин	5.2	1.5	8.8	9.7	6.7	11.7	16.7	32.0	7.5	13.3	13.8	0.0	5.8	21.7	12.5	0	0	
	9 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	18 неделя	-	-	60.7	33.0	45.3	-	53.0	-	-	-	-	20.3	-	-	-			
532	До вакцин	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	25.2	0.5	2.7	0.0	2	0	
	9 неделя	-	-	-	-	125.7	-	-	-	-	-	-	53.0	-	-	-			
	18 неделя	43.3	-	-	-	-	-	78.3	-	-	-	-	117.3	-	-	-			
651	До вакцин	0.2	0.7	0.0	0.0	1.7	0.2	2.3	1.2	2.0	2.7	0.8	0.0	1.0	3.3	2.8	1	0	
	9 неделя	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	-	-	-			
	18 неделя	-	-	-	-	68.7	-	22.0	-	9.0	-	-	20.0	-	-	-			
Среднее SFC	9 неделя	-	-	20.7	-	84.2	-	84.3	71.0	30.0	-	-	25.9	-	-	-			
	18 неделя	34.3	23.3	137.5	24.3	132.7	-	109.3	155.7	66.8	-	-	62.0	-	-	-			
№ позитивных ответов ^{е)}	9 неделя	0	0	1	0	2	0	1	1	2	0	0	3	0	0	0			
	18 неделя	2	1	2	2	3	0	4	1	2	0	0	4	0	0	0			

а) А, ЦТЛ тестировали против аналога вакцины.

б) WT, ЦТЛ тестировали против эпитопа вакцины дикого типа, соответствующего аналогу вакцины.

с) Значения указывают суммарные показатели SFC до вакцинации на 50,000 клеток, тестированные против указанного эпитопа.

д) Значения указывают суммарные показатели SFC на 50,000 клеток для позитивных ответов на вакцину.

е) Указывает SFC ответ, не соответствующий критериям, и ответ на вакцину был негативным.

f) Общее число позитивного ответа на вакцину против эпитопа вакцины дикого типа или эпитопа дикого типа, соответствующего аналогу вакцины.

Пример 2. Раннее вовлечение Т-клеток памяти, подтвержденное в испытаниях 2 фазы.

ЦТЛ иммунные ответы, измеренные посредством ELISPOT с культивированием.

Иммуногенность измеряли в клинических испытаниях 2 фазы на криоконсервированных МНКПК из каждого тестируемого образца, которые оттаивали в среде для культивирования (среде RPMI-1640 с 25 мМ HEPES, с добавлением 5% человеческой АВ сыворотки, 4 мМ L-глутамина, 0,5 мМ пирувата натрия, 0,1 мМ MEM не являющихся незаменимыми аминокислот, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 Ед./мл пенициллина), содержащей 30 мкг/мл ДНКазы. После центрифугирования в течение 5 мин при 1200 об/мин, осадок клеток ресуспендировали в 5% среде для культивирования клеток человека и отмывали 2 раза. Для ELISPOT анализа с культивированием для центральных Т-клеток памяти человека 2×10^6 /мл МНКПК помещали в пары ячеек в 48-луночные планшеты и стимулировали в течение 10 суток с 10 мкг/мл каждого пептида. В качестве положительного контроля МНКПК также стимулировали пулом бустерных вирусных пептидов. Человеческий рИЛ-2 (10 Ед./мл) добавляли к культурам, стимулированным пептидами, на 1, 4 и 7 дни. Спустя 10 дней стимулированные клетки собирали и засеивали в концентрации 5×10^4 /лунку. В лунки для анализа также вносили облученные аутологичные МНКПК (1×10^5 /лунку) и 10 мкг/мл пептида, либо вакцинного пептида, либо нерелевантного пептида, либо пептидов позитивного контроля. Клетки, стимулированные *in vitro* с каждым аналоговым эпитопом, также тестировали против соответствующего эпитопа дикого типа.

ТХЛ иммунные ответы, измеренные посредством стандартного ELISPOT.

Для ТХЛ ELISPOT анализа с целью измерения Т-хелперных ответов на PADRE эпитоп, 4×10^6 /мл МНКПК помещали в 12-луночный планшет для культивирования в течение ночи. Клетки собирали и помещали в концентрации 2×10^5 /лунку в плоскодонные 96-луночные нитроцеллюлозные планшеты, которые были предварительно покрыты моноклональным антителом к ИФН- γ (mAb) (10 мкг/мл; клон 1-D1K; Mabtech). Клетки, засеянные в 6 повторностях, стимулировали 10 мкг/мл PADRE пептида или нерелевантного малярийного SSP2 пептида. Спустя 20 ч инкубации при 37°C планшеты для анализа промывали ФБР/0,05% Твин-20 и в лунки добавляли по 100 мкл/лунку биотинилированного антитела к ИФН- γ (2 мкг/мл; клон 7-B6-1; Mabtech). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C, затем промывали 6 раз. Наконец, пятна от ИФН- γ -секретирующих клеток проявляли путем последовательной инкубации лунок с растворами Vectastain ABC и 3-амино-9-этил-карбазола (АЕС). Пятна подсчитывали посредством ридера, оснащенного компьютеризованной системой анализа изображений (Ридера Zeiss KS ELISPOT).

Анализ данных и критерии соответствия.

Среднее значение и среднеквадратическое отклонение (СКО) пятен в ячейках повторностей рассчитывали во всех анализах путем переноса необработанных данных ELISPOT из каждого эксперимента в компьютерную программу на основе Excel. Позитивные ответы Т-клеток, индуцированные вакциной, были определены в соответствии с критериями, описанными ниже.

Критерии соответствия специфического Т-клеточного ответа, индуцированного пептидами, у центральных Т-клеток памяти: положительные критерии для ЦТЛ ответов, использованные в испытаниях 2 фазы, были идентичными критериям в испытаниях $1/2$ фазы, которые были установлены перспективно после анализа вариабельности ответов до лечения у пациентов на каждый эпитоп вакцины и нерелевантный HBV контрольный эпитоп. Положительный ответ ЦТЛ/Т-клеток памяти, индуцированный пептидами, на данный эпитоп, выполнял все следующие условия:

- (1) превышал 5 SFC, по сравнению с ответом на нерелевантный эпитоп;
- (2) превышал среднее значение SFC ответа на нерелевантный эпитоп, плюс 2 СКО;
- (3) в два раза превышал SFC ответ в образце до вакцинации от того же самого пациента, плюс 2 СКО.

Включение "плюс два среднеквадратических отклонения" было использовано для подгонки вариабельности анализа и служило для повышения строгости критериев.

Критерии позитивного ТХЛ ответа на ТХЛ PADRE эпитоп, при измерении без предварительной экспансии МНКПК, были следующими:

- (1) PADRE-специфический ответ >5 результирующих SFC на 2×10^5 клеток после вычитания фона;
- (2) для каждого образца, тестируемого в 6 повторностях, значение p t-теста $<0,05$ при сравнении SFC в лунках, стимулированных нерелевантным HLA-DR связывающим малярийным пептидом, против лунок, стимулированных PADRE пептидом; и
- (3) значение p t-теста $<0,05$ при сравнении SFC при индукции путем стимуляции PADRE пептидом в образцах до и после стимуляции вакциной.

Все три критерия должны быть выполнены, чтобы ТХЛ ответ считался индуцированным вакцинацией OSE-2101.

Результаты.

Критерии набора пациентов и мониторинга иммунитета. В целом 64 HLA-A2⁺ пациента, больных

НМКРЛ III, IV стадии или рецидивом рака в испытаниях 2 фазы, лечили по меньшей мере одной дозой OSE-2101. 33 пациента завершили начальную фазу исследования, состоящую из шести доз OSE-2101, применяемых с 3-недельными интервалами, и у них контролировали ответы эпитоп-индуцированных Т-клеток/Т-клеток памяти. Результаты анализов этой группы пациентов описаны ниже, при этом обращается особое внимание на ранний ответ на 9 неделе (после 3 инъекций) и 18 неделе (после 6 инъекций).

Широта ответов ЦТЛ/центральных Т-клеток памяти, индуцированных у каждого из 11 первых пациентов, и профиль иммуногенности отдельных эпитопов вакцины были очень схожими с показателями клинических испытаний $1/2$ фазы у пациентов на ранней стадии НМКРЛ и толстой кишки, с менее тяжелым заболеванием.

Большинство ответов ЦТЛ эффекторов/Т-клеток памяти у получающих лечение пациентов было индуцировано во время исходной фазы лечения 3-6 дозами/18 недель и, неожиданно, всего спустя 3 недели (3 дозы). Предпочтительно ответы ЦТЛ/Т-клеток памяти, индуцированные во время этого периода, включая те, которые направлены на эпитопы дикого типа, должны поддерживаться путем непрерывной ревакцинации с подкожными инъекциями OSE-2101 с интервалами 2-3 месяца.

Для оставшихся 22 пациентов, у которых можно было провести лейкоферез и тестирование иммуногенности, общие данные показали, что иммунный мониторинг образцов против пяти или больше иммуногенно релевантных эпитопов в продукте (CEA.24V9 (SEQ ID NO: 3), CEA.605D6 (SEQ ID NO: 9), HER2.369V2V9 (SEQ ID NO: 4), MAGE3.11215 (SEQ ID NO: 8) и MAGE2.157 (SEQ ID NO: 2)) был достаточным для определения иммуногенности Т-клеток и центральных Т-клеток памяти. Клиническими точками времени, выбранными для периодического тестирования, были моменты до лечения, 9, 18 и 30 недели, поскольку большинство ответов ЦТЛ/центральных Т-клеток памяти, наблюдаемых у первых 11 пациентов, у которых проводили анализ, было уже индуцировано на 9 и 18 неделе и некоторые поддерживались на 30 неделе.

Иммуногенность OSE 2101 была схожей при испытаниях 2 фазы у пациентов с запущенным раком (HLA A2-позитивных больных НМКРЛ на поздней стадии инвазивного или метастатического рака и после безуспешной терапии по меньшей мере первой линии) с тем, что наблюдалось раньше в двух испытаниях $1/2$ фазы с точки зрения общей ширины ответов ЦТЛ⁺/центральных Т-клеток памяти, индуцированных у пациентов, и уровня иммуногенности индивидуальных эпитопов, таким образом подтверждая общую активность продукта в различных популяциях пациентов. Многоспецифичные ответы ЦТЛ⁺/центральных Т-клеток памяти, определенные по ответам по меньшей мере на 3-5 типичных иммуногенных эпитопов при лечении OSE-2101, наблюдались у 22 из 23 пациентов (67%), у которых проводился мониторинг в испытаниях 2 фазы, и которые достигались уже на 9 неделе.

Таблица 2

Антиген	Эпитоп	Неделя 9 %	Неделя 18 %	Неделя 30 %	Месяц 9 %	Месяц 12 %
CEA	CEA24-ANA	13/33: 39%	10/32: 31%	9/23: 28%	4/7: 57%	2/4: 50%
	CEA24-WT	12/33: 36%	7/32: 22%	5/23: 22%	2/7: 29%	1/4: 0%
	CEA605-ANA	9/33: 27%	10/32: 31%	8/23: 35%	1/7: 14%	1/4: 25%
	CEA605-WT	10/33: 30%	5/32: 16%	8/23: 35%	1/7: 14%	0/4: 0%
	CEA691-ANA	7/11: 64%	10/11: 91%	2/6: 33%	3/7: 43%	2/4: 50%
	CEA691-WT	0/11: 0%	0/11: 0%	0/6: 0%	0/7: 0%	0/4: 0%
HER2	HER2.369-ANA	14/33: 42%	14/32: 44%	13/23: 57%	2/7: 29%	2/4: 50%
	HER2.369-WT	11/33: 33%	9/32: 28%	10/23: 43%	2/7: 29%	2/4: 50%
	HER2-689-WT	4/11: 36%	3/11: 27%	0/6: 0%	0/7: 0%	0/4: 0%
MAGE	MAGE2.157-WT	9/33: 27%	9/32: 28%	10/23: 43%	4/7: 57%	2/4: 50%
	MAGE3.112-ANA	10/33: 30%	8/32: 25%	10/23: 43%	0/7: 0%	0/4: 0%
	MAGE3.112-WT	10/33: 30%	3/32: 9%	5/23: 22%	0/7: 0%	0/4: 0%
p53	p53.139-ANA	6/11: 55%	4/11: 36%	3/6: 50%	2/7: 29%	2/4: 50%
	p53.139-WT	2/11: 18%	1/11: 9%	0/6: 0%	0/7: 0%	0/4: 0%
	p53.149-ANA	1/11: 9%	0/11: 0%	0/6: 0%	0/7: 0%	0/4: 0%
	p53.149-WT	0/11: 0%	1/11: 9%	0/6: 0%	0/7: 0%	0/4: 0%

ANA = аналоговый пептид,

WT = пептид дикого типа.

У первых 11 пациентов тестировали все 9 пептидных эпитопов, а у остальных 22 пациентов тестировали 5 выделенных цветом эпитопов (CEA24 (SEQ ID NO: 3), CEA605 (SEQ ID NO: 9), HER2.369 (SEQ ID NO: 4), MAGE2.157 (SEQ ID NO: 2) и MAGE3.112 (SEQ ID NO: 8)). Результаты также показаны на фиг. 2.

Ранний ответ на 9 неделе был на том же самом уровне, как ответ на 18 неделе, а долговременный ответ все еще присутствовал в течение одного года у пациентов, у которых можно было проводить лейкоферез. Долговременный ответ поддерживался посредством дополнительных инъекций.

ТХЛ ответы измеряли в МНКПК без этапа экспансии *in vitro* посредством стандартного ELISPOT. МНКПК размораживали, инкубировали в среде в течение ночи и стимулировали 2×10^5 МНКПК/лунку с 10 мкг/мл эпитопа Pan DR (ТХЛ) или нерелевантного малярийного пептида в ELISPOT анализе интерферона-гамма.

ИФН- γ продуцирующие Т-хелперные клетки против PADRE были выявлены у 18 из 33 тестируемых пациентов (55%), без кратковременной экспансии МНКПК *in vitro* с пептидом и были в том же самом диапазоне на 9 и 18 неделях, демонстрируя ранний ТХЛ ответ на комбинацию эпитопов.

При этом существует корреляция между OSE-2101-индуцированными PADRE ТХЛ ответами и ответами ЦТЛ/центральных Т-клеток памяти (фиг. 3). Коэффициент корреляции для этого анализа составил 0,405.

Пример 3. Влияние на время до прогрессирования заболевания (ВДП) посредством раннего ответа Т-клеток памяти.

Результаты ВДП для комбинации коротких пептидов при запущенном НМКРЛ после безуспешной терапии по меньшей мере первой линии (данные внутреннего отчета об испытаниях OSE 2101 2 фазы). При клинической оценке в онкологии присутствие высоких уровней инфильтрующих Т-клеток памяти, при иммуногистохимической оценке, коррелировало с отсутствием признаков ранней метастатической инвазии, менее запущенной патологической стадией и повышенной выживаемостью для 959 образцов, полученных при резекции колоректального рака (Pages, F. et al., 2005, N Engl. J. Med.; 353:2654-2666). ВДП интересно как когерентный суррогатный элемент, связанный с эффекторными Т-клетками памяти для длительной и безрецидивной выживаемости.

63 пациента, HLA-A2-позитивных и получавших OSE-2101, были включены в анализ времени до прогрессирования (ВДП). У 28 пациентов отмечалось документированное прогрессирование заболевания. С применением расчета по методу Каплана-Мейера средняя медиана времени до прогрессирования составила 285 дней.

Медиана времени до прогрессирования (медиана ВДП) после комбинации коротких пептидов OSE-2101 составила 285 дней или 9,4 месяца (СКО 86 дней). Этот важный клинический элемент связан с ранней стимуляцией эффекторных CD8⁺ цитотоксических Т-клеток памяти (ВДП определяется как время от рандомизации до объективного прогрессирования опухоли; ВДП не включает смерть. ВБП определяется как время от рандомизации до объективного прогрессирования опухоли или смерти).

В том же самом типе популяции с запущенным НМКРЛ (инвазивным или метастатическим) и после безуспешной терапии по меньшей мере первой линии (при терапии второй линии) выживание без прогрессирования составило 2,2 месяца с ингибитором тирозинкиназы, таким как эрлотиниб (Shepherd F.A., et al., 2005, N Engl. J. Med.; 353, 123-132).

Два агента для химиотерапии, доцетаксел и пеметрексед, и эрлотиниб в настоящее время утверждены в качестве терапии второй линии у больных НМКРЛ. Наблюдаемое ВДП в двух клинических испытаниях 3 фазы для доцетаксела составило от 10,6 до 26 недель. По результатам клинических испытаний 3 фазы для пеметрекседа медиана ВБП составила 2,9 месяца (M.A. Bareschino; J. Thorac. Dis. 2011; 3:122-133). Медиана ВБП составила 3,5 месяцев в клинических испытаниях 3 фазы для инволумаба при плоскоклеточном НМКРЛ (Julie Brahmer, et al., 2015, New England Journal of Medicine, May 31).

Неожиданные ранние результаты индукции ЦТЛ посредством индукции центральных Т-клеток памяти короткими эпитопными последовательностями опухолевых антигенов из вакцины OSE-2101 продемонстрировали клиническую эффективность комбинации эпитопов в качестве Т-специфической иммунотерапии рака, и в особенности кратковременных иммунных ответов Т-клеток памяти, обеспечивающих долговременную эффективность у больных раком с плохим прогнозом.

Пример 4. Результаты у больных запущенным раком со злокачественным плевральным выпотом (ЗПВ).

У пациентов присутствует ЗПВ в качестве осложнения сильно запущенного рака или в качестве исходного проявления основной злокачественной опухоли. Общие типы рака, вызывающие ЗПВ, включают лимфомы, мезотелиомы, и карциномы молочной железы, легкого, желудочно-кишечного тракта и яичников. Ежегодная частота злокачественных плевральных выпотов в Соединенных Штатах составляет больше 150,000 случаев. Кривые выживаемости для более 8,000 больных немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ) с плевральным выпотом (т.е. стадией ППВ) из базы данных SEER показали, что долговременная выживаемость нехарактерна для данной группы. Медиана времени выживания составляет примерно 3 месяца. Плевральный выпот ограничивает вентиляцию и вызывает прогрессирующую одышку за счет сжатия легочной ткани, а также парадоксальное движение инвертированной диафрагмы. Плевральные выпоты опухоли вызывают плевритную боль.

Плевральные выпоты чаще встречаются у пациентов с запущенными опухолями, которые часто дают метастазы в головной мозг, кости и другие органы; физиологические недостаточности; недостаточность питания; слабость и другие сопутствующие симптомы. Из-за этих многочисленных клинических и патологических факторов трудно выполнить перспективные испытания у пациентов с плевральным выпотом. По этой же причине часто трудно прогнозировать потенциальный результат лечения или ожидаемую продолжительность выживаемости для конкретного пациента с множеством взаимосвязанных клинических проблем. Плевральный выпот был первым симптомом рака у 41% из 209 пациентов со злокачественным плевральным выпотом; наиболее распространенными были рак легких у мужчин (42%) и рак яичника у женщин (27%).

Обнаружение злокачественных клеток в плевральной жидкости и/или париетальной плевре свиде-

тельствует о диссеминированном или запущенном заболевании и о снижении ожидаемой продолжительности жизни у больных раком.

Для понимания роли центральных Т-клеток памяти, открытых у больных раком в клинических испытаниях 2 фазы, авторы настоящего изобретения проанализировали ретроспективно подгруппу пациентов со злокачественным плевральным выпотом. Исследование было построено для оценки безопасности, эффективности (ответа и выживаемости) и иммуногенности OSE-2101 у пациентов с запущенным НМКРЛ (стадии IIIВ и IV), которые были HLA-A2-позитивными. Многоэпитопную комбинацию вводили подкожно в дозе 5 мг каждые 3 недели в течение первых 15 недель, затем каждые 2 месяца в течение 1 года, затем один раз в три месяца в течение 2 года.

В подгруппе из пяти пациентов отмечался плевральный выпот, у двух пациентов был НМКРЛ стадии IIIВ, а у трех был НМКРЛ стадии IV с метастазами.

В соответствии с данными литературы пациенты со злокачественным плевральным выпотом (ЗПВ) имеют плохой прогноз с интраторакальными и экстраторакальными злокачественными новообразованиями. Медиана выживаемости после диагноза ЗПВ составляет 3-4 месяца. У этих пациентов ожидалось худшее время выживаемости, и, таким образом, предполагалось, что они умрут первыми, вскоре во время исследования.

У этих пяти пациентов с ЗПВ было достигнуто, после получения OSE-2101 Т-специфической иммунотерапии, длительное время без прогрессирования, а также очень долговременное выживание.

Таблица 3А

Описание ЗПВ у пациентов с НМКРЛ

Номер пациента	166 (центр 115) НМКРЛ	104 (центр 121) НМКРЛ	172 (центр 116) НМКРЛ	144 (центр 217) НМКРЛ	170 (центр 217) НМКРЛ
Пол	женщина	женщина	мужчина	мужчина	женщина
Возраст	58 лет	73 года	88 лет	55 лет	45 лет
Этническое происхождение	Азиатка	Европеоид	Европеоид	Европеоид	Афро-американка
Стадия НМКРЛ	IIIВ	IIIВ	IV	IV	IV
ЗПВ	Плевральный выпот + перикардиальный выпот	Плевральный выпот	Плевральный выпот	Плевральный выпот	Плевральный выпот
Предыдущее лечение	Перикардиоцентез, радиотерапия грудной клетки (10300 сГр) и химиотерапия 1 линии, карбоплатин + паклитаксел	Торакоцентез, радиотерапия грудной клетки (70,2 сГр) и химиотерапия 1 линии, карбоплатин + паклитаксел	Радиотерапия грудной клетки (5940 Гр) и химиотерапия 1 линии, цисплатин + VP16	Радиотерапия грудной клетки (5040 Гр) и химиотерапия 4 линии, карбоплатин + паклитаксел, тарцева, топотекан, алимта	Торакоцентез и химиотерапия 3 линии, карбоплатин + паклитаксел + гемзар, экспериментальный препарат TRM 1; тарцева

Таблица 3В

Время до прогрессирования - общая выживаемость ОВ - число инъекций

Номер пациента	166 НМКРЛ	121 НМКРЛ	172 НМКРЛ	144 НМКРЛ	170 НМКРЛ
ОВ	20 месяцев	19 месяцев	18 месяцев	6 месяцев	26 месяцев
Время до прогрессирования	Стабильное отсутствие прогрессирования до 20 месяцев	19 месяцев	6 месяцев	5 месяцев	3 месяца
Ответы ЦТЛ + центральных Т-клеток памяти	ЦТЛ+/ центральных Т-клеток памяти против 4 эпитопов	ЦТЛ+/ центральных Т-клеток памяти против 4 эпитопов	ЦТЛ+/ центральных Т-клеток памяти против 4 эпитопов	Нет	Нет
Число инъекций	3 +9	3+7	3+6	3+2	3

Время до прогрессирования, достигнутое в такой популяции ЗПВ с плохим прогнозом, является впечатляющим, с медианой больше 6 месяцев (от 3 до 20 месяцев). Средняя выживаемость составила 18 месяцев (от 6 до 26 месяцев). Эти долговременные клинические результаты связаны с исходным применением из 3 инъекций, обеспечивающим раннее вовлечение эффекторных CD8⁺ Т-клеток, рекрутирующих центральные Т-клетки памяти. Кроме того, у трех пациентов из пяти отмечаются выраженные положительные ответы на четыре эпитопа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ Т-специфической иммунотерапии с использованием пептидов при лечении рака у HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2)-позитивного пациента, включающей пептиды aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 10, где X и a соответственно указывают циклогексилаланин и d-аланин),

RLLQETELV (SEQ ID NO: 1),
 YLQLVFGIEV (SEQ ID NO: 2),
 LLTFWNPPV (SEQ ID NO: 3),
 KVFGSLAFV (SEQ ID NO: 4),
 KLBPVQLWV (SEQ ID NO: 5, где В указывает α -аминоизомасляную кислоту),
 SMPPPGTRV (SEQ ID NO: 6),
 IMIGHLVGV (SEQ ID NO: 7),
 KVAEIVHFL (SEQ ID NO: 8) и
 YLSGADLNL (SEQ ID NO: 9),

где указанное лечение включает период примирования, состоящий из трех применений указанной Т-специфической иммунотерапии, терапевтическими пептидами каждые три недели, посредством этого индуцируя ответ центральных Т-клеток памяти, и где за периодом примирования следует поддерживающий период, в течение которого введение указанной Т-специфической иммунотерапии с использованием пептидов проводится каждые два-восемь месяцев.

2. Способ по п.1, где в поддерживающем периоде применение указанной Т-специфической иммунотерапии терапевтическими пептидами осуществляют каждые два-три месяца, более предпочтительно каждые два месяца в течение одного года, а затем каждые три месяца в течение одного года.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где указанный рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, такого как НМКРЛ (немелкоклеточный рак легкого) и мелкоклеточный рак легкого, меланомы, мезотелиомы, рака молочной железы, первичных злокачественных опухолей головного мозга, рака яичника, рака матки, особенно рака тела матки и/или рака шейки матки, рака головы и шеи, рака толстой кишки или колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака почки, саркомы, герминогенных опухолей, лейкоза, лимфомы, рака яичка и рака мочевого пузыря; предпочтительно выбран из группы, состоящей из НМКРЛ, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника и рака головы и/или шеи, более предпочтительно НМКРЛ.

4. Способ по любому из пп.1-3, где указанный пациент страдает запущенным раком или раком на поздней стадии.

5. Способ по любому из пп.1-4, где указанный пациент страдает метастазами, особенно метастазами в головной мозг.

6. Способ по любому из пп.1-5, где указанный пациент имеет злокачественный плевральный выпот.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанный пациент является ТХЛ (хелперные Т-клетки)-позитивным.

8. Способ по любому из пп.1-7, где Т-специфическую иммунотерапию терапевтическими пептидами применяют парентерально, предпочтительно подкожно.

9. Способ по любому из пп.1-8, где пептиды эмульгированы в неполном адьюванте Фрейнда или тому подобном, предпочтительно Montanide ISA-51.

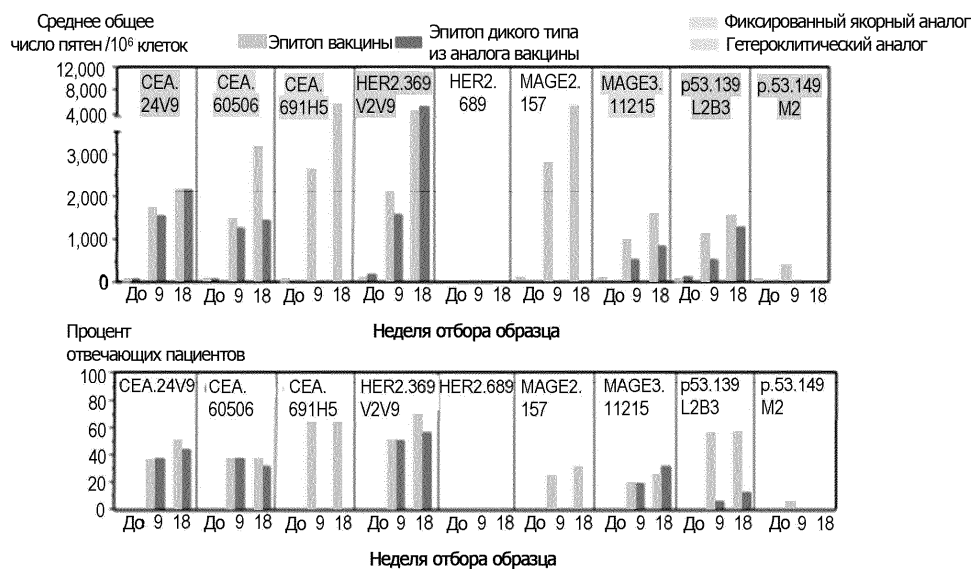
10. Способ по любому из пп.1-9, где дозы пептида находятся в диапазоне от 0,1 до 10 мг пептида на вводимую дозу.

11. Способ по п.10, где общая доза пептидов для каждой инъекции составляет 5,0 мг.

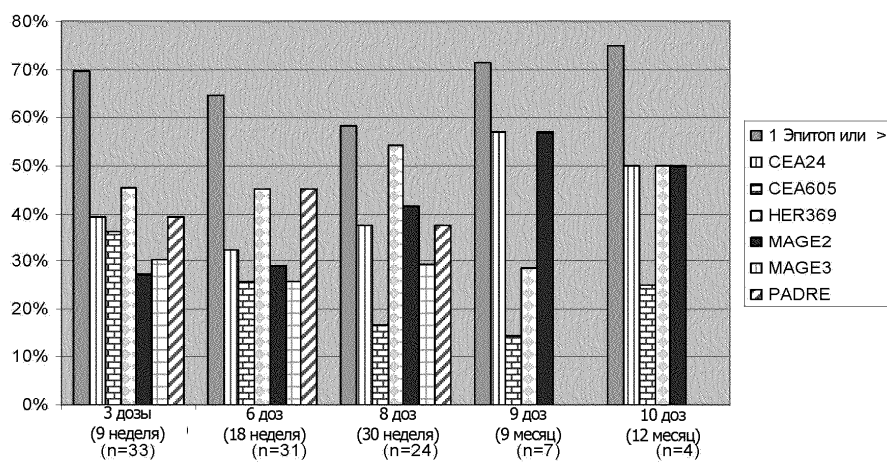
12. Способ по любому из пп.1-11, где указанный пациент уже получил несколько линий лечения до лечения Т-специфической иммунотерапией терапевтическими пептидами.

13. Способ по любому из пп.1-12, где указанное лечение применяют в комбинации с лечением другим противоопухолевым лекарственным средством и/или радиотерапией.

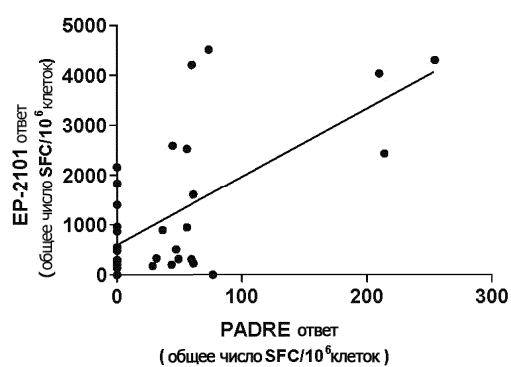
14. Способ по любому из пп.1-13, где указанное лечение применяют в комбинации с лечением ингибитором контрольных точек, предпочтительно ингибитором CTLA-4 и/или PD-1/PD-L1, таким как пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, BMS936559, MEDI4736, AMP-224, AMP-514, MPDL3280A и авелумаб.



ФИГ. 1

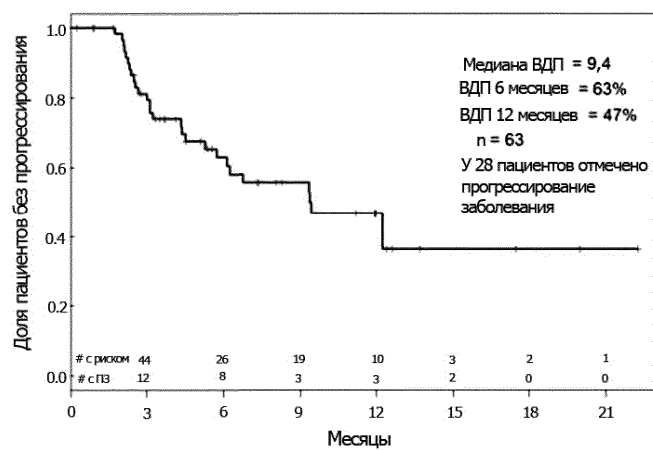


ФИГ. 2



Фиг. 3

Расчет ВДП по методу Каплана-Мейера



Фиг. 4

