

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043063**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.21

(21) Номер заявки
201990530

(22) Дата подачи заявки
2017.08.18

(51) Int. Cl. **A61K 38/19** (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ПУТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ PD-1/PD-L1 И/ИЛИ ИНГИБИТОРОВ CTLA-4 С БИОЛОГИЧЕСКИМ СРЕДСТВОМ, СОДЕРЖАЩИМ НЕСКОЛЬКО ЦИТОКИНОВЫХ КОМПОНЕНТОВ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **62/377,051**

(32) **2016.08.19**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/US2017/047477**

(87) **WO 2018/035395 2018.02.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

БРУКЛИН

ИММУНОТЕРАПЬЮТИКС ЭлЭлСи

(US)

(72) Изобретатель:

Хадден Джон В. (US), Беринштайн

Нил Л. (CA), Эган Джеймс Е. (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М. (RU)

(56) **WO-A2-2016054555**

US-A1-20120064035

US-A1-20130330325

PATEL et al. "PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy", Molecular Cancer Therapeutics, 18 February 2015 (18.02.2015), Vol. 14, No. 4, Pgs. 847-856, entire document

US-A1-20130243723

PARDOLL, D. "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy", Nature Reviews Cancer, 22 March 2012 (22.03.2012), Vol. 12, No. 4, Pgs. 252-264, entire document

TAUBE et al. "Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy", Clinical Cancer Research, 8 April 2014 (08.04.2014), Vol. 20, No. 19, Pgs. 5064-5074, entire document

VAN ALLEN et al. "Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma", Science, 10 September 2015 (10.09.2015), Vol. 350, No. 6257, Pgs. 207-211, entire document

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения рака, например, путем введения субъекту, имеющему рак, полученного из первичных клеток биологического средства с несколькими цитокиновыми компонентами в комбинации с антагонистом лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) или белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1) и/или с антагонистом ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4). Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам идентификации субъекта для лечения с помощью антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 или оценки вероятности того, что субъект будет восприимчив к антагонисту PD-L1 или PD-1 и/или антагонисту CTLA-4.

B1

043063

043063

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет согласно § 119(e) 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 62/377051, поданной 19 августа 2016 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Ингибиторы PD-1 и PD-L1 являются ингибиторами контрольной точки, которые применяют для лечения различных форм рака. К сожалению, экспрессия PD-L1 в микроокружении опухоли, которая может быть одним из важных параметров, коррелирующих с эффективностью ингибиторов PD-1/PD-L1 и даже необходимых для нее, варьируется в зависимости от типа опухоли и у отдельных пациентов (см., например, Taube et al., *Clin Cancer Res*; 20(19):5064-74 (2014) и Sunshine and Taube, *Current Opinion in Pharmacology*, 23:32-38 (2015)). Ингибиторы CTLA-4 также являются ингибиторами контрольной точки, которые разрабатывают для лечения различных форм рака. Также было показано, что экспрессия CTLA-4 коррелирует с эффективностью ингибиторов CTLA-4. В результате остается необходимость в увеличении доли пациентов, которые получают пользу от лечения ингибиторами PD-1/PD-L1 и/или CTLA-4, или в повышении степени ответа на такие ингибиторы.

Краткое описание изобретения

Аспекты настоящего изобретения относятся к способам и композициям, в которых используют полученное из первичных клеток биологическое средство для повышения терапевтической эффективности антагонистов лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1) и/или ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4), например, для лечения рака. Как описано в данном документе, неожиданно было обнаружено, что дистальное введение полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ , в лимфатические узлы пациентов, больных раком, приводит к сильной локальной активации PD-L1 и CTLA-4 в опухоли. Экспрессия PD-L1 на клетках опухоли, на инфильтрирующих иммунных клетках и в микроокружении опухоли сильно коррелирует с эффективностью антагониста PD-1/PD-L1 и может потребоваться для этого (см., например, Taube et al., *Clin. Cancer Res.*; 20(19):5064-74 (2014); Sunshine and Taube, *Current Opinion in Pharmacology*, 23:32-38 (2015); Garon et al. *N Engl. J. Med.*, 372:2018-2028 (2015); Schmid et al., *European Cancer Congress, Abstract Number*, 3017 (2015) и Carbognin et al., *PLoS ONE*, 10(6):e0130142 (2015)). Также было показано, что повышенная экспрессия CTLA-4 коррелирует с повышенной эффективностью антагониста CTLA-4 (см., например, Jamieson et al., *Gene-expression profiling to predict responsiveness to immunotherapy. Cancer Gene Therapy* (2017), 24:134-140 и Van Allen et al., *Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. Science* (2015), 350(6257):207-211). Соответственно, не желая быть связанными какой-либо теорией, ожидается, что введение полученного из первичных клеток биологического средства, которое, как продемонстрировано в данном документе, приводит к активации PD-L1 самой опухолью или иммунными клетками, инфильтрирующими опухоль, будет повышать эффективность антагонистов PD-L1 или PD-1, например, путем увеличения числа пациентов, которые отвечают на эти антагонисты, и/или путем повышения степени антагонистического ответа. Подобным образом, опять же, не желая быть связанными какой-либо теорией, ожидается, что введение полученного из первичных клеток биологического средства, которое, как продемонстрировано в данном документе, приводит к активации CTLA-4 в пределах микроокружения опухоли (предположительно на иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль), будет повышать эффективность антагонистов CTLA-4, например, путем увеличения числа пациентов, которые отвечают на эти антагонисты, и/или путем повышения степени антагонистического ответа.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака или предракового поражения у субъекта (например, субъекта-человека), при этом способ включает:

(a) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека); и

(b) введение субъекту эффективного количества антагониста лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) или белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1), где введение полученного из первичных клеток биологического средства и введение антагониста осуществляют в разных местоположениях у субъекта и/или в разные моменты времени.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют по меньшей мере до одного введения антагониста. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют по меньшей мере до одного введения антагониста, и по меньшей мере одно дополнительное введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют после по меньшей мере одного введения антагониста. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение антагониста осуществляют по меньшей мере до одного введения полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления по меньшей

мере одно введение антагониста осуществляют по меньшей мере до одного введения полученного из первичных клеток биологического средства, и по меньшей мере одно дополнительное введение антагониста осуществляют после по меньшей мере одного введения полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят подкожно или перилимфатически, а антагонист вводят внутривенно или перорально. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят один раз в день в течение 10 дней, а антагонист PD-L1 или PD-1 вводят один раз каждые две-четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело является специфичным в отношении PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559 и авелумаба. В некоторых вариантах осуществления антагонистом является CA-170. В некоторых вариантах осуществления антитело является специфичным в отношении PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680 и REGN2810. В некоторых вариантах осуществления антагонистом является AMP-224.

В некоторых вариантах осуществления субъект является невосприимчивым к лечению антагонистом до введения полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления уровень PD-L1 в опухоли субъекта повышается после введения полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 2 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 3 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 22-657 международных единиц (МЕ) IL-1 β , 29-478 МЕ IL-2, 10-185 МЕ IFN- γ , 29-600 МЕ TNF- α , 34-2895 МЕ IL-6 и 5-244 МЕ IL-8. Значения МЕ можно рассчитать, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 220-6700 пг IL-1 β , 1730-28100 пг IL-2, 560-10900 пг IFN- γ , 580-12000 пг TNF- α , 260-22100 пг IL-6 и 4610-243600 пг IL-8. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту химического ингибитора, выбранного из группы, состоящей из алкилирующих средств, антиметаболитов, антибиотиков и иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления алкилирующим средством является циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту NSAID, выбранного из группы, состоящей из индометацина, ибупрофена, целекоксиба, рофекоксиба и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления NSAID представляет собой индометацин. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предусмотренных в данном документе, способ дополнительно включает введение субъекту цинка.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества антагониста ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4). В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело (например, человеческое или гуманизированное антитело). В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелиумаба.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологиче-

ских злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (H&NSCC, также называемой SCCHN), рака мочеоловой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака или предракового поражения у субъекта (например, субъекта-человека), при этом способ включает:

(а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека); и

(б) введение субъекту эффективного количества антагониста лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) или белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1), где антагонист выбран из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559, авелумаба и CA-170.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 2 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 3 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 22-657 международных единиц (МЕ) IL-1 β , 29-478 МЕ IL-2, 10-185 МЕ IFN- γ , 29-600 МЕ TNF- α , 34-2895 МЕ IL-6 и 5-244 МЕ IL-8. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 220-6700 пг IL-1 β , 1730-28100 пг IL-2, 560-10900 пг IFN- γ , 580-12000 пг TNF- α , 260-22100 пг IL-6 и 4610-243600 пг IL-8. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту химического ингибитора, выбранного из группы, состоящей из алкилирующих средств, антиметаболитов, антибиотиков и иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления алкилирующим средством является циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту NSAID, выбранного из группы, состоящей из индометацина, ибупрофена, целекоксиба, рофекоксиба и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления NSAID представляет собой индометацин. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предусмотренных в данном документе, способ дополнительно включает введение субъекту цинка.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества антагониста ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4). В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело (например, человеческое или гуманизованное антитело). В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелиумаба.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или мелкоклеточный рак легкого (SCLC)), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (H&NSCC, также называемой SCCHN), рака мочеоловой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезоте-

лиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ отбора субъекта (например, субъекта-человека) для лечения, при этом способ включает:

(а) определение уровня PD-L1 в образце опухоли, полученном от субъекта, имеющего рак или предраковое поражение, и которому вводили полученное из первичных клеток биологическое средство, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека); и

(б) введение субъекту эффективного количества антагониста PD-L1 или PD-1, если уровень PD-L1 в образце опухоли выше порогового уровня PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления определение включает проведение анализа для выявления уровня PD-L1. В некоторых вариантах осуществления анализ выбран из группы, состоящей из гибридизации *in situ*, RT-qPCR, анализа на микрочипах, мультиплексного анализа экспрессии РНК, секвенирования РНК, иммуногистохимического анализа, проточной цитометрии, мультиплексного анализа белков и анализа с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления уровень PD-L1 в образце опухоли представляет собой уровень PD-L1 в клеточных мембранах (например, мембранах клеток опухоли, мембранах клеток иммунного инфильтрата и/или мембранах стромальных клеток) в образце опухоли. В некоторых вариантах осуществления определение включает проведение иммуногистохимического анализа, и пороговый уровень PD-L1 представляет собой частичное или полное окрашивание клеточных мембран у 49% жизнеспособных клеток опухоли в образце опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение полученного из первичных клеток биологического средства субъекту до этапа определения.

В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антисмысловую олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело является специфичным в отношении PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559 и авелумаба. В некоторых вариантах осуществления антагонистом является CA-170. В некоторых вариантах осуществления антитело является специфичным в отношении PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из ниволюмаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680 и REGN2810. В некоторых вариантах осуществления антагонистом является AMP-224.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 2 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 3 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство включает 22-657 международных единиц (МЕ) IL-1 β , 29-478 МЕ IL-2, 10-185 МЕ IFN- γ , 29-600 МЕ TNF- α , 34-2895 МЕ IL-6 и 5-244 МЕ IL-8. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 220-6700 пг IL-1 β , 1730-28100 пг IL-2, 560-10900 пг IFN- γ , 580-12000 пг TNF- α , 260-22100 пг IL-6 и 4610-243600 пг IL-8. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) и SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (H&NSCC, также называемой SCCHN), рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ оценки вероятности того, что

субъект (например, субъект-человек) будет восприимчив к антагонисту PD-L1 или PD-1, при этом способ включает:

(а) введение полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека) субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, при которых экспрессируется первый уровень PD-L1, который является ниже порогового уровня PD-L1; и

(b) определение второго уровня PD-L1 в образце опухоли у субъекта после введения полученного из первичных клеток биологического средства, при этом второй уровень PD-L1, который выше порогового уровня PD-L1, является показателем того, что субъект будет восприимчив к антагонисту PD-L1 или PD-1.

В некоторых вариантах осуществления определение включает проведение анализа для выявления второго уровня PD-L1. В некоторых вариантах осуществления анализ выбран из группы, состоящей из гибридизации *in situ*, RT-qPCR, анализа на микрочипах, мультиплексного анализа экспрессии РНК, секвенирования РНК, иммуногистохимического анализа, проточной цитометрии, мультиплексного анализа белков и анализа с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления второй уровень PD-L1 представляет собой уровень PD-L1 в клеточных мембранах (например, мембранах клеток опухоли, мембранах клеток иммунного инфильтрата и/или мембранах стромальных клеток) в образце опухоли. В некоторых вариантах осуществления определение включает проведение иммуногистохимического анализа, и пороговый уровень PD-L1 представляет собой частичное или полное окрашивание клеточной мембраны по меньшей мере у 49% жизнеспособных клеток опухоли в образце опухоли.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (H&NSCC, также называемой SCCHN), рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В еще одних аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта (например, субъекта-человека), при этом способ включает:

введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека); и

введение субъекту эффективного количества антагониста ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4), где введение полученного из первичных клеток биологического средства и введение антагониста осуществляют в разных местоположениях у субъекта и/или в разные моменты времени.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют по меньшей мере до одного введения антагониста. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют по меньшей мере до одного введения антагониста, и по меньшей мере одно дополнительное введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют после по меньшей мере одного введения антагониста. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение антагониста осуществляют по меньшей мере до одного введения полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно введение антагониста осуществляют по меньшей мере до одного введения полученного из первичных клеток биологического средства, и по меньшей мере одно дополнительное введение антагониста осуществляют по меньшей мере после одного введения полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят подкожно или перилимфатически, а антагонист вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят один раз в день до 10 дней, а антагонист вводят один раз каждые 3-12 недель.

В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелиумаба.

В некоторых вариантах осуществления субъект является невосприимчивым к лечению антагани-

стом до введения полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления уровень CTLA-4 в опухоли субъекта повышается после введения полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 22-657 международных единиц (МЕ) или 220-6700 пг IL-1 β , 29-478 МЕ или 1730-28100 пг IL-2, 10-185 МЕ или 560-10900 пг IFN- γ , 29-600 МЕ или 580-12000 пг TNF- α , 34-2895 МЕ или 260-22100 пг IL-6 и 5-244 МЕ или 4610-243600 IL-8. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту химического ингибитора, выбранного из группы, состоящей из алкилирующих средств, антиметаболитов, антибиотиков и иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления алкилирующим средством является циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту NSAID, выбранного из группы, состоящей из индометацина, ибупрофена, целекоксиба, рофекоксиба и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления NSAID представляет собой индометацин. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту цинка.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества антагониста PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизованное антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 выбран из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559, авелумаба и CA-170.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта (например, человека), при этом способ включает введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, L-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека); и введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, где антагонист выбран из группы, состоящей из ипилизумаба и тремелиумаба.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α . В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 22-657 международных единиц (МЕ) или 220-6700 пг IL-1 β , 29-478 МЕ или 1730-28100 пг IL-2, 10-185 МЕ или 560-10900 пг IFN- γ , 29-600 МЕ или 580-12000 пг TNF- α , 34-2895 МЕ или 260-22100 пг IL-6 и 5-244 МЕ или 4610-243600 IL-8. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство допол-

нительно содержит GM-CSF и G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту химического ингибитора, выбранного из группы, состоящей из алкилирующих средств, антиметаболитов, антибиотиков и иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления алкилирующим средством является циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту NSAID, выбранного из группы, состоящей из индометацина, ибупрофена, целекоксиба, рофекоксиба и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления NSAID представляет собой индометацин. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту цинка.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества антагониста PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 выбран из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559, авелумаба и CA-170.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В еще одних аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ отбора субъекта (например, человека) для лечения, при этом способ включает:

определение уровня CTLA-4 в образце опухоли, полученном от субъекта, имеющего рак, и которому вводили полученное из первичных клеток биологическое средство, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, L-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека); и

введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, если уровень CTLA-4 в образце опухоли выше порогового уровня CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления определение включает проведение анализа для выявления уровня CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления анализ выбран из группы, состоящей из гибридизации *in situ*, RT-qPCR, анализа на микрочипах, мультиплексного анализа экспрессии РНК, секвенирования РНК, иммуногистохимического анализа, проточной цитометрии, мультиплексного анализа белков и анализа с помощью вестерн-блоттинга.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение полученного из первичных клеток биологического средства субъекту до этапа определения. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелиумаба.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α . В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство включает 22-657 международных единиц (МЕ) или 220-6700 пг IL-1 β , 29-478 МЕ или 1730-28100 пг IL-2, 10-185 МЕ или 560-10900 пг IFN- γ , 29-600 МЕ или 580-12000 пг TNF- α , 34-2895 МЕ или 260-22100 пг IL-6 и 5-244 МЕ или 4610-243600 IL-8. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого-

го (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В других аспектах способ оценки вероятности того, что субъект (например, субъект-человек) будет восприимчив к антагонисту CTLA-4, при этом способ включает введение полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ (например, L-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека), субъекту, имеющему рак, при котором экспрессируется первый уровень CTLA-4, который является ниже порогового уровня CTLA-4; и определение второго уровня CTLA-4 в образце опухоли у субъекта после введения полученного из первичных клеток биологического средства, где второй уровень CTLA-4, который выше порогового уровня CTLA-4, является показателем того, что субъект будет восприимчив к антагонисту CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления определение включает проведение анализа для выявления второго уровня CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления анализ выбран из группы, состоящей из гибридизации *in situ*, RT-qPCR, анализа на микрочипах, мультиплексного анализа экспрессии РНК, секвенирования РНК, иммуногистохимического анализа, проточной цитометрии, мультиплексного анализа белков и анализа с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или SCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных выше, полученное из первичных клеток биологическое средство можно заменить комбинацией цитокинов, как описано в данном документе (например, включающей IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), которые можно вводить вместе (например, в виде смеси цитокинов) или отдельно.

Краткое описание графических материалов

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения, которые могут быть лучше поняты при обращении к одному или нескольким из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

Фиг. 1 представляет собой набор фотографий срезов опухоли от пациента до лечения согласно схеме лечения полученным из первичных клеток биологическим средством, описанной в примере 1 (биопсия), и после лечения согласно схеме лечения полученным из первичных клеток биологическим средством (резекция). Срезы опухоли окрашивают антителами к биомаркерам лимфоцитов, включая CD68, CD8, CD4, CD8/FOXP3 и CD4/FOXP3. На фиг. 1 показано, что в образце резекции наблюдается больше окрашивания, что указывает на инфильтрацию лимфоцитов как CD4, так и CD8 Т-клеток в опухоль после лечения.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий разницу в средней мембранной интенсивности экспрессии PD-L1 после лечения 7 пациентов, прошедших лечение согласно схеме лечения полученным из первичных клеток биологическим средством, описанной в примере 1 (до операции). Каждый столбец представляет одного пациента. На оси Y показано изменение средней мембранной интенсивности PD-L1 до и после лечения полученным из первичных клеток биологическим средством. На фиг. 2 показано, что у 4 пациентов наблюдались показатели увеличения экспрессии PD-L1 после лечения полученным из первичных клеток биологическим средством.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий изменение уровней экспрессии mRNA CTLA-4 после лечения 7 пациентов, прошедших лечение согласно схеме лечения полученным из первичных клеток биологическим средством, описанной в примере 1 (до операции). Каждый столбец представляет одного пациента. На оси Y показано изменение уровней экспрессии mRNA CTLA-4 до и после лечения полученным из первичных клеток биологическим средством. На фиг. 3 показано, что у 5 пациентов наблю-

дались показатели увеличения экспрессии CTLA-4 после лечения полученным из первичных клеток биологическим средством.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, в которых применяют полученное из первичных клеток биологическое средство, чтобы индуцировать и/или усилить терапевтический ответ на антагонист PD-1/PD-L1 и/или антагонист CTLA-4, чтобы сделать субъектов восприимчивыми к лечению антагонистом PD-1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA-4 или чтобы отобрать субъектов для лечения антагонистом PD-1/PD-L1 и/или антагонистом CTLA-4.

Полученное из первичных клеток биологическое средство.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению полученного из первичных клеток биологического средства, например, согласно способу или в композиции, как описано в данном документе. Используемый в данном документе термин "полученное из первичных клеток биологическое средство" представляет собой биологическую композицию, содержащую несколько цитокиновых компонентов, предпочтительно нерекомбинантных цитокинов, которые получены или взяты из первичных клеток, например человеческих мононуклеарных клеток, которые простимулировали митогеном и 4-аминохинолоновым антибиотиком. Иллюстративным полученным из первичных клеток биологическим средством является IRX-2 (см., например, Egan et al. (2007), J. Immunother, 30(6):624-633, в котором описана иллюстративная партия IRX-2 в табл. 1, и IRX-2, как описано в патенте США № 8470562, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). IRX-2 представляет собой полученное из первичных клеток биологическое средство, вырабатываемое при стимуляции очищенных лейкоцитов человека (мононуклеарных клеток) фитогемагглютинином (PHA) и ципрофлоксацином. IRX-2 включает следующие цитокины: IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека, которые, как полагают, являются наиболее активными компонентами биологического средства, а также GM-CSF человека и G-CSF человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство содержит интерлейкин-1 бета (IL-1 β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерферон-гамма (IFN- γ). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство содержит L-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF человека и G-CSF человека.

В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство доставляют субъекту, например, в количестве, эффективном для увеличения экспрессии PD-L1 и/или CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемое субъекту, определяют с помощью международных единиц (МЕ) или МЕ на миллилитр (МЕ/мл) одного или нескольких цитокинов, присутствующих в полученном из первичных клеток биологическом средстве. МЕ и МЕ/мл для каждого цитокина устанавливаются Национальным институтом биологических стандартов и контролей (NIBSC), и им присваивается код, который приведен в таблице ниже. Доступ к информации, связанной с каждым кодом, можно получить с помощью ссылки на веб-сайт NIBSC (nibsc.org). МЕ и МЕ/мл можно определить путем измерения единиц цитокинов в пикограммах (пг) или пг на миллилитр (пг/мл) с использованием соответствующего набора для тестирования R&D Systems, представленного в таблице ниже, которые преобразуют в МЕ или МЕ/мл соответственно с применением приведенных в таблице ниже коэффициентов пересчета, которые являются значениями, полученными из руководства по применению наборов для тестирования R&D Systems.

Цитокин	Коэффициент пересчета: пг/мл в МЕ/мл (умножить пг/мл на коэффициент пересчета с получением МЕ/мл)	Стандартный код NIBSC	№ по каталогу наборов для тестирования R&D Systems
IL-1 β	0,098	86/552	DLB50
IL-2	0,017	86/500	D2050
IFN- γ	0,017	82/587	DIF50
TNF- α	0,050	88/786	DTA00C
IL-6	0,131	89/548	D6050
IL-8	0,001	89/520	D8000C
G-CSF	0,120	88/502	DCS50
GM-CSF	0,008	88/646	DGM00

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит по меньшей мере 1 МЕ (например, по меньшей мере 1 МЕ, по меньшей мере 2 МЕ или по меньшей мере 3 МЕ) каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ , например IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит по меньшей мере 0,05 МЕ (например, по меньшей мере 0,05 МЕ, по меньшей мере 0,1 МЕ или по меньшей мере 1 МЕ) GM-CSF и по меньшей мере 1 МЕ (например, по меньшей мере 1 МЕ, по меньшей мере 2 МЕ или по меньшей мере 3 МЕ) G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, включает 22-657 МЕ (например, 30-147 МЕ) IL-1 β , например IL-1 β человека; 29-478 МЕ (например, 67-156 МЕ) IL-2, например IL-2 человека; 10-185 МЕ (например, 13-53 МЕ) IFN- γ , например IFN- γ человека; 29-600 МЕ (например, 36-150 МЕ) TNF- α , например TNF- α человека; 34-2895 МЕ (например, 89-524 МЕ) IL-6, например IL-6 человека; и 5-244 МЕ (например, 10-64 МЕ) IL-8, IL-8 человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 7-456 МЕ (например, 7-84 МЕ) G-CSF и 0,08-28 МЕ (например, 2-6 МЕ) GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает концентрацию IL-1 β , например человеческого IL-1 β , в диапазоне 22-657 МЕ/мл (например, 30-147 МЕ/мл); концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 29-478 МЕ/мл (например, 67-156 МЕ/мл); концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 10-185 МЕ/мл (например, 13-53 МЕ/мл); концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 29-600 МЕ/мл (например, 36-150 МЕ/мл); концентрацию IL-6, например IL-6 человека, в диапазоне 34-2895 МЕ/мл (например, 89-524 МЕ/мл) и концентрацию IL-8, например IL-8 человека, в диапазоне 5-244 МЕ/мл (например, 10-64 МЕ/мл). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает концентрацию G-CSF в диапазоне 7-456 МЕ/мл (например, 7-84 МЕ/мл) и концентрацию GM-CSF в диапазоне 0,08-28 МЕ/мл (например, 2-6 МЕ/мл).

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит каждый цитокин в соотношении с количеством IL-2, присутствующим в полученном из первичных клеток биологическом средстве. В некоторых вариантах осуществления нижний предел соотношения для конкретного цитокина можно рассчитать, взяв самое низкое значение МЕ (например, самое низкое значение МЕ, описанное в данном документе) для конкретного цитокина и разделив его на самое низкое значение МЕ (например, самое низкое значение МЕ, описанное в данном документе) для IL-2. В некоторых вариантах осуществления верхний предел соотношения для конкретного цитокина можно рассчитать, взяв самое высокое значение МЕ (например, самое высокое значение МЕ, описанное в данном документе) для конкретного цитокина и разделив его на самое высокое значение МЕ (например, самое высокое значение МЕ, описанное в данном документе) для IL-2. В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологиче-

ского средства, доставляемого субъекту, предусматривает соотношение МЕ IL-1 β (например, МЕ IL-1 β человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,45 до 1,37 (например, от 0,45 до 0,94); соотношение МЕ IFN- γ (например, МЕ IFN- γ человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,19 до 0,39 (например, от 0,19 до 0,34); соотношение МЕ TNF- α (например, МЕ TNF- α человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,53 до 1,26 (например, от 0,53 до 0,96); соотношение МЕ IL-6 (например, МЕ IL-6 человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 1,16 до 6,06 (например, от 1,32 до 3,35), и соотношение МЕ IL-8 (например, МЕ IL-8 человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,15 до 0,51 (например, от 0,15 до 0,41). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например, GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает соотношение МЕ G-CSF (например, МЕ G-CSF человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,11 до 0,95 (например, от 0,11 до 0,54), и соотношение МЕ GM-CSF (например, МЕ GM-CSF человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,002 до 0,06 (например, от 0,03 до 0,04).

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, определяют с применением пг или пг/мл одного или нескольких цитокинов, присутствующих в полученном из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 220-6700 пг (например, 310-1500 пг) IL-1 β , например IL-1 β человека; 1730-28100 пг (например, 3960-9200 пг) IL-2, например IL-2 человека; 560-10900 пг (например, 750-3100 пг) IFN- γ , например IFN- γ человека; 580-12000 пг (например, 720-3000 пг) TNF- α , например TNF- α человека; 260-22100 пг (например, 680-4000 пг) IL-6, например IL-6 человека; и 4610-243600 пг (например, 10390-63800 пг) IL-8, например IL-8 человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например, GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 60-3800 пг (например, 60-700 пг) G-CSF и 10-3500 пг (например, 250-800 пг) GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 220-6700 пг/мл (например, 310-1500 пг/мл); концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 1730-28100 пг/мл (например, 3960-9200 пг/мл); концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 560-10900 пг/мл (например, 750-3100 пг/мл); концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 580-12000 пг/мл (например, 720-3000 пг/мл); концентрацию IL-6, например IL-6 человека, в диапазоне 260-22100 пг/мл (например, 680-4000 пг/мл); и концентрацию IL-8, например IL-8 человека, в диапазоне 4610-243600 пг/мл (например, 10390-63800 пг/мл).

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 300-1400 пг/мл; концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 4000-8000 пг/мл; концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 1000-3800 пг/мл и концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 1000-4300 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает концентрацию G-CSF в диапазоне 60-3800 пг/мл (например, 60-700 пг/мл) и концентрацию GM-CSF в диапазоне 10-3500 пг/мл (например, 250-800 пг/мл).

Иллюстративные способы выработки полученного из первичных клеток биологического средства, такого как IRX-2, раскрыты в патентах США № 8470562, 5632983 и 5698194, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Например, полученное из первичных клеток биологическое средство можно получить путем очистки мононуклеарных клеток (MNC), извлеченных у доноров-людей, инкубирования MNC в течение ночи, стимуляции MNC митогеном (например, непрерывной или импульсной стимуляции PHA) и 4-аминохинолоновым антибиотиком (например, непрерывной стимуляции ципрофлоксацином) для получения цитокинов, удаления митогена путем фильтрации, очистки цитокинов путем фильтрации для получения исходного супернатанта полученного из первичных клеток биологического средства и отделения исходного супернатанта полученного из первичных клеток биологического средства от ДНК и случайных средств с применением анионообменной хроматографии и фильтрации вирусов с получением тем самым полученного из первичных клеток биологического средства, например, содержащего L-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека.

Другие иллюстративные полученные из первичных клеток биологические средства и способы выработки полученных из первичных клеток биологических средств раскрыты, например, в патенте США

№ 6896879, который включен в данный документ посредством ссылки.

Антагонисты PD-L1 или PD-1.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антагонистам лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) или белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1) и их применению в композициях и способах, описанных в данном документе.

Антагонист PD-1, применяемый в данном документе, представляет собой средство, которое подавляет или предотвращает активность PD-1, например, путем связывания с PD-1. Антагонист PD-1 может снижать активность PD-1 в клетке или организме, например, на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с клеткой или организмом, которые не подвергались воздействию антагониста PD-1. PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на Т-клетках, В-клетках и макрофагах. PD-1 человека кодируется геном PDCD1 (ID 5133 в Genbank Entrez). PD-1 функционирует в качестве иммунной контрольной точки и отрицательно регулирует иммунные ответы, например иницируя гибель клеток (апоптоз) и, таким образом, подавляя активацию, размножение и/или функцию CD8⁺ Т-клеток и других иммунных клеток. Было обнаружено, что PD-L1, лиганд для PD-1, в высокой степени экспрессируется при нескольких видах рака, и несколько антагонистов PD-1 разрабатываются или одобрены для лечения рака.

Активности PD-1 могут препятствовать антитела, которые селективно связываются и блокируют активность PD-1. Активность PD-1 также можно подавить или блокировать молекулами, отличными от антител, которые связывают PD-1. Такие молекулы включают белки (такие как слитые белки), малые молекулы и пептиды, например пептидные миметики PD-L1 и PD-L2, которые связывают PD-1, но не активируют PD-1. Средства, которые связывают и разлагают или подавляют ДНК или mRNA, кодирующую PD-1, также могут действовать в качестве антагонистов PD-1. Примеры включают siRNA, направленные против PD-1, и бессмысловые олигонуклеотиды, направленные против PD-1.

Иллюстративные антагонисты PD-1 включают описанные в публикациях заявок на патент США № 20130280265, 20130237580, 20130230514, 20130109843, 20130108651, 20130017199, 20120251537 и 20110271358 и в европейском патенте EP2170959B1, полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Другие иллюстративные антагонисты PD-1 описаны в Curran et al., PNAS, 107, 4275 (2010); Topalian et al., New Engl. J. Med. 366, 2443 (2012); Brahmer et al., New Engl. J. Med. 366, 2455 (2012); Dolan et al., Cancer Control. 21, 3 (2014) и Sunshine et al., Curr. Opin. in Pharmacol. 23 (2015).

Иллюстративные антагонисты PD-1 включают ниволумаб (например, OPDIVO® от Bristol-Myers Squibb), полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое связывает PD-1; пидилизумаб (например, CT-011 от CureTech), гуманизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывает PD-1; пембролизумаб (например, KEYTRUDA® от Merck), гуманизированное моноклональное антитело IgG4-каппа, которое связывает PD-1; MEDI-0680 (AstraZeneca/MedImmune), моноклональное антитело, которое связывает PD-1; и REGN2810 (Regeneron/Sanofi), моноклональное антитело, которое связывает PD-1. Еще одним иллюстративным антагонистом PD-1 является AMP-224 (Glaxo Smith Kline и Amplimmune), рекомбинантный слитый белок, состоящий из внеклеточного домена лиганда 2 белка программируемой смерти клеток (PD-L2) и Fc-области IgG1 человека, который связывается с PD-1.

Антагонист PD-L1, применяемый в данном документе, представляет собой средство, которое подавляет или предотвращает активность PD-L1, например, путем связывания с PD-L1. Антагонист PD-L1 может снижать активность PD-L1 в клетке или организме, например, на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с клеткой или организмом, которые не подвергались воздействию антагониста PD-L1.

PD-L1 представляет собой трансмембранный белок типа 1 с V-подобными и C-подобными доменами иммуноглобулина. PD-L1 является лигандом для рецептора PD-1. PD-L1 человека кодируется геном CD274 (ID 29126 в Genbank Entrez). PD-L1 экспрессируется как гематопозитическими, такими как В-клетки и Т-клетки, так и негематопозитическими клетками. Связывание PD-L1 с PD-1 ведет к активации PD-1, что приводит к инициации гибели клеток (апоптозу) и подавлению вышеупомянутых иммунных ответов, например подавлению активации, распространения и/или функции CD8⁺ Т-клеток и других иммунных клеток. PD-L1 также связывается с CD80 (также известным как B7-1).

Активность PD-L1 можно блокировать молекулами, которые селективно связываются с PD-L1 и блокируют его активность, например, путем блокирования взаимодействия с PD-1 и/или B7-1 и их активации. Активность PD-L1 также можно подавить или блокировать молекулами, отличными от антител, которые связывают PD-L1. Такие молекулы включают белки (такие как слитые белки), малые молекулы и пептиды. Средства, которые связывают и разлагают или подавляют ДНК или mRNA, кодирующую PD-L1, также могут действовать в качестве антагонистов PD-L1. Примеры включают siRNA, направленные против PD-L1, и бессмысловые олигонуклеотиды, направленные против PD-L1.

Иллюстративные антагонисты PD-L1 включают описанные в публикациях заявок на патент США № 20090055944, 20100203056, 20120039906, 20130045202, 20130309250 и 20160108123, полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Другие иллюстративные антагонисты PD-L1 описаны в Sunshine et al., Curr. Opin. in Pharmacol. 23 (2015).

Антагонисты PD-L1 включают, например, атезолизумаб (также называемый MPDL3280A или TECENTRIQ™, Genentech/Roche), человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1; дурвалумаб (также называемый MEDI4736 или IMFINZI™, AstraZeneca/MedImmune), человеческое моноклональное антитело иммуноглобулин IgG1 каппа, которое связывается с PD-L1; BMS-936559 (Bristol-Meyers Squibb), полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-L1; авелумаб (также называемый MSB 0010718C или BAVENCIO®, Merck KGaA/Pfizer), полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, которое связывается с PD-L1; и CA-170 (Aurigene/Curis), низкомолекулярный антагонист PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 представляет собой антитело, такое как гуманизованное или человеческое антитело. Используемый в данном документе термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с конкретным антигеном, таким как PD-L1 или PD-1, и включает поликлональные, моноклональные, генно-инженерные и иным образом модифицированные формы антител, в том числе без ограничения химерные антитела, гуманизованные антитела, полностью человеческие антитела, гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела, диатела, триатела и тетратела), и антигенсвязывающие фрагменты антител, в том числе, например, фрагменты Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG и scFv. Кроме того, если не указано иное, подразумевается, что термин "моноклональное антитело" включает как интактные молекулы, так и фрагменты антител (такие как, например, фрагменты Fab и F(ab')₂), которые способны специфически связываться с антигеном. Антитело может включать константный домен иммуноглобулина из любого иммуноглобулина, такого как подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA (включая IgA1 и IgA2), IgE, IgD или IgM.

Антагонисты CTLA-4.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антагонистам ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4) и их применению в композициях и способах, описанных в данном документе.

Антагонист CTLA-4, применяемый в данном документе, представляет собой средство, которое подавляет или предотвращает активность CTLA-4, например, путем связывания с CTLA-4. Антагонист CTLA-4 может снижать активность CTLA-4 в клетке или организме, например, на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с клеткой или организмом, которые не подвергались воздействию антагониста CTLA-4. CTLA-4 (также известный как CTLA4 и CD152) представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на Т-клетках. CTLA-4 человека кодируется геном CTLA4 (ID 1493 в Genbank Entrez). CTLA-4 функционирует в качестве иммунной контрольной точки и отрицательно регулирует иммунные ответы, например, путем передачи подавляющих сигналов Т-клеткам.

Активности CTLA-4 могут препятствовать антитела, которые селективно связываются и блокируют активность CTLA-4. Активность CTLA-4 также можно подавить или заблокировать молекулами, отличными от антител, которые связывают CTLA-4. Такие молекулы включают белки (такие как слитые белки), малые молекулы и пептиды, например пептидные миметики CD80 или CD86, которые связывают CTLA-4, но не активируют CTLA-4. Средства, которые связывают и разлагают или подавляют ДНК или mRNA, кодирующую CTLA-4, также могут действовать в качестве антагонистов CTLA-4. Примеры включают siRNA, направленные против CTLA-4, и антисмысловые олигонуклеотиды, направленные против CTLA-4.

Иллюстративные антагонисты CTLA-4 включают описанные в публикациях согласно РСТ № WO 2001/014424, WO 2012/118750, европейском патенте № EP 1212422B1, патентах США № 5811097, 5855887, 6051227, 6984720, 7034121, 7824679, 8017114, 8475790, 8318916, 8685394, публикациях заявок на патент США № 2002/0039581, 2005/0201994 и 2009/0117037, полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Другие иллюстративные антагонисты CTLA-4 описаны в Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505 (2004) (антитело CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304(1998) и Lipson and Drake, Clin. Cancer Res.; 17(22), November 15, 2011, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Иллюстративные антагонисты CTLA-4 включают ипилимумаб (YERVOY®, Bristol-Myers Squibb), который представляет собой рекомбинантное человеческое моноклональное антитело IgG1 против CTLA-4, и тремелиумаб/CP-675206 (AstraZeneca; MedImmune; Pfizer), который представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG2 против CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело, такое как гуманизованное или человеческое антитело. Антитело к CTLA-4 может представлять собой антитело любого типа, в том числе поликлональные, моноклональные, генно-инженерные и иным образом модифицированные формы антител, включая, без ограничения, химерные антитела, гуманизованные антитела, полностью человеческие антитела, гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела, диатела, триатела и тетратела), и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например,

фрагменты Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG и scFv.

Способы лечения и фармацевтические композиции.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения, например, лечения рака или предракового поражения. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе (например, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе (например, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе (например, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, как описано в данном документе, и эффективного количества антагониста PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления введение полученного из первичных клеток биологического средства и антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 осуществляют отдельно во времени (например, когда полученное из первичных клеток биологическое средство и антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 вводят в виде отдельных композиций, и по меньшей мере одно введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют в другое время, чем по меньшей мере одно введение антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4), и/или их вводят в разных местоположениях у субъекта (например, различными путями введения, где полученное из первичных клеток биологическое средство и антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 вводят в виде отдельных композиций). В некоторых вариантах осуществления способа, когда антагонист PD-L1 или PD-1 и антагонист CTLA-4 используют в комбинации, антагонист PD-L1 или PD-1 и антагонист CTLA-4 вводят совместно. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 или PD-1 и антагонист CTLA-4 вводят раздельно во времени.

В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство и антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 вводят в один и тот же день, но в разных местоположениях у субъекта (например, различными путями введения, где полученное из первичных клеток биологическое средство и антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 вводят в виде отдельных композиций). В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 или PD-1 вводят внутривенно или перорально. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят подкожно, перилимфатически (например, путем подкожной инъекции или катетеризации в ткань, окружающую лимфатический узел), с помощью катетера, интранодально, перитуморально или интратуморально. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят перилимфатически или интранодально в одно или несколько следующих лож лимфатических узлов: подмышечные, шейные, надключичные, подключичные, дельтовидные, паховые, бедренные, средостенные, субпекторальные, внутренние молочных желез и/или забрюшинные ложа лимфатических узлов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу полученного из первичных клеток биологического средства вводят по меньшей мере до одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу полученного из первичных клеток биологического средства вводят по меньшей мере до одной дозы антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу полученного из первичных клеток биологического средства вводят по меньшей мере до одной дозы антагониста CTLA-4 и по меньшей мере одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу полученного из первичных клеток биологического средства вводят после по меньшей мере одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу полученного из первичных клеток биологического средства вводят после по меньшей мере одной дозы антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу полученного из первичных клеток биологического средства вводят после по меньшей мере одной дозы антагониста CTLA-4 и по меньшей мере одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют как до, так и после антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления введение полученного из первичных клеток

биологического средства осуществляют как до, так и после антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют как до, так и после антагониста CTLA-4 и антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления введение антагониста PD-L1 или PD-1 осуществляют как до, так и после полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления введения антагониста CTLA-4 осуществляют как до, так и после полученного из первичных клеток биологического средства. В некоторых вариантах осуществления введения антагониста CTLA-4 и антагониста PD-L1 или PD-1 осуществляют как до, так и после полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления введения полученного из первичных клеток биологического средства и антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 происходит в течение нескольких циклов. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят в течение одного или нескольких циклов продолжительностью до 10 дней (например, 4, 5 или 10 дней), таких как введение один раз в день в течение периода до 10 дней (например, один раз в день в течение 4, 5 или 10 дней), где дни являются последовательными или могут включать один или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или 5) дней, когда биологическое средство не доставляют, например, в течение выходных дней. В некоторых вариантах осуществления один или несколько циклов продолжительностью до 10 дней являются частью одного или нескольких 21-дневных циклов с использованием нескольких средств. В некоторых вариантах осуществления в течение каждого 21-дневного цикла циклофосфамид вводят на 1-й день (например, внутривенно при 300 мг/м²); индометацин (например, 25 мг перорально три раза в день), омепразол (например, 20 мг перорально) и цинк (например, от 15 до 30 мг перорально) вводят ежедневно в течение 21 дня, и полученное из первичных клеток биологическое средство, как описано в данном документе (например, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), вводят ежедневно в течение 4, 5 или 10 дней (например, последовательно или в виде двух блоков последовательных дней с одним или несколькими днями между ними), начиная с 4-го дня каждого цикла. Иллюстративная схема введения дозы показана в таблице ниже.

Иллюстративная 21-дневная схема введения дозы для полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе.

Средство	Доза	Путь введения	Дни лечения
Циклофосфамид	300 мг/м ²	IV	1
Индометацин	25 мг TID (три раза в день)	Перорально	1-21
Содержащие цинк мультивитамины	1 таблетка, содержащая от 15 до 30 мг цинка	Перорально	1-21
Омепразол	20 мг	Перорально	1-21
Полученное из первичных клеток биологическое средство (например, IRX-2)	Дозу, определенную как 230 МЕ IL-2 в биологическом средстве, вводят ежедневно (Билатеральные инъекции по 115 МЕ IL-2)	Подкожно в лимфатический узел, регионарный для данного рака, или рядом с ним	Любые десять дней между 4-м и 15-м днями

В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 или PD-1 вводят в течение одного или нескольких 2-4-недельных циклов, где введение антагониста осуществляют раз в две-четыре недели или ежедневно в течение каждого цикла (например, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели или ежедневно в течение каждого цикла). В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 вводят в течение одного или нескольких 3-12-недельных циклов, где введение антагониста осуществляют раз в 3-12 недель (например, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в восемь недель или раз в двенадцать недель).

В некоторых вариантах осуществления в способе, описанном в данном документе, применяют схему введения дозы, где полученное из первичных клеток биологическое средство вводят в течение цикла продолжительностью до 10 дней, как описано выше (необязательно в виде части 21-дневного цикла, описанного выше), а антагонист PD-L1 или PD-1 вводят в течение 2-4-недельного цикла, как описано выше, где схему введения дозы повторяют по меньшей мере один раз (например, повторяют 1, 2, 3 или 4 раза в год). В некоторых вариантах осуществления схемы полученное из первичных клеток биологическое средство вводят до антагониста PD-L1 или PD-1. В других вариантах осуществления схемы антагонист PD-L1 или PD-1 вводят до полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления в способе, описанном в данном документе, применяют схему введения дозы, где полученное из первичных клеток биологическое средство вводят в течение цикла продолжительностью до 10 дней, как описано выше (необязательно в виде части 21-дневного цикла, описанного выше), а антагонист CTLA-4 вводят в течение 3-12-недельного цикла, как описано выше, где схему введения дозы повторяют по меньшей мере один раз (например, повторяют 1, 2, 3 или 4 раза в год). В некоторых вариантах осуществления схемы полученное из первичных клеток биологическое средство вводят до антагониста CTLA-4. В других вариантах осуществления схемы антагонист CTLA-4 вводят до полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления в способе, описанном в данном документе, применяют схему введения дозы, где полученное из первичных клеток биологическое средство вводят в течение цикла продолжительностью до 10 дней, как описано выше (необязательно в виде части 21-дневного цикла, описанного выше), а антагонист CTLA-4 вводят в течение 3-12-недельного цикла, как описано выше, и антагонист PD-L1 или PD-1 вводят в течение 2-4-недельного цикла, как описано выше, где схему введения дозы повторяют по меньшей мере один раз (например, повторяют 1, 2, 3 или 4 раза в год). В некоторых вариантах осуществления схемы полученное из первичных клеток биологическое средство вводят до антагониста CTLA-4 и антагониста PD-L1 или PD-1. В других вариантах осуществления схемы антагонист CTLA-4 и антагонист PD-L1 или PD-1 вводят до полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предусмотренных в данном документе, способ дополнительно включает введение дополнительных средств. В некоторых вариантах осуществления дополнительным средством является химический ингибитор, выбранный из группы, состоящей из алкилирующих средств (например, циклофосфида), антиметаболитов, антибиотиков и иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления дополнительным средством является NSAID, выбранное из группы, состоящей из индометацина, ибупрофена, целекоксиба, рофекоксиба и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления дополнительным средством является цинк. В некоторых вариантах осуществления дополнительным средством является комбинация циклофосфида, индометацина и цинка.

"Эффективное количество" средства обычно относится к количеству, достаточному для того, чтобы вызвать желаемый биологический ответ, например, лечение состояния. Как будет понятно специалистам в данной области, эффективное количество средства, описанного в данном документе, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, подвергаемое лечению, способ введения, а также возраст, состав организма и состояние здоровья субъекта. Эффективное количество может охватывать количество, которое обеспечивает улучшение общего лечения, уменьшение или избегание симптомов или причин состояния или повышение терапевтической эффективности другого терапевтического средства.

Для лечения рака эффективное количество представляет собой количество, достаточное для обеспечения терапевтической пользы при лечении рака, такой как замедление, остановка или регресс роста раковых клеток и/или уничтожение раковых клеток, или уменьшение или устранение одного или нескольких симптомов, ассоциированных с раком.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства представляет собой количество, достаточное для повышения уровня экспрессии PD-L1 в опухоли субъекта, и/или количество, достаточное для обеспечения и/или повышения терапевтической эффективности антагониста PD-1 или PD-L1, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства представляет собой количество, достаточное для повышения уровня экспрессии CTLA-4 в опухоли субъекта, и/или количество, достаточное для обеспечения и/или повышения терапевтической эффективности антагониста CTLA-4, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства представляет собой количество, достаточное для повышения уровня экспрессии PD-L1 и CTLA-4 в опухоли субъекта, и/или количество, достаточное для обеспечения и/или повышения терапевтической эффективности антагониста PD-1 или PD-L1 и антагониста CTLA-4, как описано в данном документе.

Иллюстративные эффективные количества антител, таких как антитела к PD-1 и антитела к PD-L1, включают от 0,01 до 20 мг/кг каждые 1-4 недели. Другие иллюстративные эффективные количества антител, таких как антитела к CTLA-4, включают от 3 до 15 мг/кг каждые 3-12 недель. В вариантах осуще-

ствления такое введение осуществляется до тех пор, пока заболевание, например рак, сохраняется. Примеры схем введения дозы и путей введения иллюстративных антагонистов PD-1 и PD-L1 и CTLA-4 приведены в таблице ниже и предполагаются для применения согласно любому способу, описанному в данном документе.

Антагонист PD-1	Схема введения дозы (например, количество и время введения дозы)	Путь введения
Ниволумаб (OPDIVO®)	3 мг/кг один раз в 2 недели или 240 мг один раз в 2 недели	Внутривенная инфузия в течение 60 минут
Пидилизумаб (CT-011)	1,5, 3 мг/кг или 6 мг/кг один раз в 2 недели или раз в месяц	Внутривенная инфузия в течение 2 часов
Пембролизумаб (KEYTRUDA®)	2 мг/кг один раз в 3 недели или 200 мг один раз в 3 недели	Внутривенная инфузия в течение 30 минут
MEDI-0680	Один раз в две недели в течение одного года	Внутривенная инфузия
REGN2810	3 мг/кг один раз в две недели	Внутривенная инфузия в течение 30 минут
AMP-224	До 10 мг/кг один раз в две недели	Внутривенная инфузия
Антагонист PD-L1	Схема введения дозы (количество и время введения дозы)	Путь введения
Атезолизумаб (TECENTRIQ™)	1200 мг один раз в три недели	Внутривенная инфузия в течение 60 минут
Дурвалумаб (IMFINZI™)	10 мг/кг раз в две недели или 1500 мг один раз в 14, 21 или 28 дней	Внутривенная инфузия в течение 1 часа
BMS-936559	0,3, 1, 3 или 10 мг/кг (необязательно в виде схемы с повышением дозы) один раз в две недели	Внутривенная инфузия
Авелумаб (BAVENCIO®)	10 мг/кг или 5 мг/кг один раз в две недели	Внутривенная инфузия в течение 60 минут
CA-170	Один раз в день в течение 21 дня	Перорально
Антагонист CTLA-4	Схема введения дозы (количество и время введения дозы)	Путь введения
Ипилимумаб (YERVOY®)	3 мг/кг один раз в три недели (например, до четырех доз в целом)	Внутривенная инфузия в течение 90 минут
Тремелимумаб	15 мг/кг или 75 мг один раз в четыре, восемь или 12 недель (например, до четырех доз в целом)	Внутривенная инфузия

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологиче-

ского средства, доставляемого субъекту, содержит по меньшей мере 1 МЕ (например, по меньшей мере 1 МЕ, по меньшей мере 2 МЕ или по меньшей мере 3 МЕ) каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ , например IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит по меньшей мере 0,05 МЕ (например, по меньшей мере 0,05 МЕ, по меньшей мере 0,1 МЕ или по меньшей мере 1 МЕ) GM-CSF и по меньшей мере 1 МЕ (например, по меньшей мере 1 МЕ, по меньшей мере 2 МЕ или по меньшей мере 3 МЕ) G-CSF. В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 22-657 МЕ (например, 30-147 МЕ) IL-1 β , например IL-1 β человека; 29-478 МЕ (например, 67-156 МЕ) IL-2, например IL-2 человека; 10-185 МЕ (например, 13-53 МЕ) IFN- γ , например, IFN- γ человека; 29-600 МЕ (например, 36-150 МЕ) TNF- α , например TNF- α человека; 34-2895 МЕ (например, 89-524 МЕ) IL-6, например IL-6 человека; и 5-244 МЕ (например, 10-64 МЕ) IL-8, например IL-8 человека. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 7-456 МЕ (например, 7-84 МЕ) G-CSF и 0,08-28 МЕ (например, 2-6 МЕ) GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит каждый цитокин в соотношении с количеством IL-2, присутствующим в полученном из первичных клеток биологическом средстве. В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает соотношение МЕ IL-1 β (например, МЕ IL-1 β человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,45 до 1,37 (например, от 0,45 до 0,94); соотношение МЕ IFN- γ (например, МЕ IFN- γ человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,19 до 0,39 (например, от 0,19 до 0,34); соотношение МЕ TNF- α (например, МЕ TNF- α человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,53 до 1,26 (например, от 0,53 до 0,96); соотношение МЕ IL-6 (например, МЕ IL-6 человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 1,16 до 6,06 (например, от 1,32 до 3,35), и соотношение МЕ IL-8 (например, МЕ IL-8 человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,15 до 0,51 (например, от 0,15 до 0,41). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, предусматривает соотношение МЕ G-CSF (например, МЕ G-CSF человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,11 до 0,95 (например, от 0,11 до 0,54), и соотношение МЕ GM-CSF (например, МЕ GM-CSF человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,002 до 0,06 (например, от 0,03 до 0,04).

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе, предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 22-657 МЕ/мл (например, 30-147 МЕ/мл); концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 29-478 МЕ/мл (например, 67-156 МЕ/мл); концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 10-185 МЕ/мл (например, 13-53 МЕ/мл); концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 29-600 МЕ/мл (например, 36-150 МЕ/мл); концентрацию IL-6, например IL-6 человека, в диапазоне 34-2895 МЕ/мл (например, 89-524 МЕ/мл); и концентрацию IL-8, например IL-8 человека, в диапазоне 5-244 МЕ/мл (например, 10-64 МЕ/мл).

В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства дополнительно предусматривает концентрацию G-CSF в диапазоне 7-456 МЕ/мл (например, 7-84 МЕ/мл) и концентрацию GM-CSF в диапазоне 0,08-28 МЕ/мл (например, 2-6 МЕ/мл). В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе, предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 300-1400 пг/мл; концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 4000-8000 пг/мл; концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 1000-3800 пг/мл и концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 1000-4300 пг/мл.

В некоторых вариантах осуществления количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 220-6700 пг (например, 310-1500 пг) IL-1 β , например IL-1 β человека; 1730-28100 пг (например, 3960-9200 пг) IL-2, например IL-2 человека; 560-10900 пг (например, 750-3100 пг) IFN- γ , например IFN- γ человека; 580-12000 пг (например, 720-3000 пг) TNF- α , например, TNF- α человека; 260-22100 пг (например, 680-4000 пг) IL-6, например IL-6 человека; и 4610-243600 пг (например, 10390-63800 пг) IL-8, например IL-8 человека. В некоторых вариантах осуществе-

ствления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество полученного из первичных клеток биологического средства, доставляемого субъекту, содержит 60-3800 пг (например, 60-700 пг) G-CSF и 10-3500 пг (например, 250-800 пг) GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе, предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 220-6700 пг/мл (например, 310-1500 пг/мл); концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 1730-28100 пг/мл (например, 3960-9200 пг/мл); концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 560-10900 пг/мл (например, 750-3100 пг/мл); концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 580-12000 пг/мл (например, 720-3000 пг/мл); концентрацию IL-6, например IL-6 человека, в диапазоне 260-22100 пг/мл (например, 680-4000 пг/мл); и концентрацию IL-8, например IL-8 человека, в диапазоне 4610-243600 пг/мл (например, 10390-63800 пг/мл). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства дополнительно предусматривает концентрацию G-CSF в диапазоне 60-3800 пг/мл (например, 60-700 пг/мл) и концентрацию GM-CSF в диапазоне 10-3500 пг/мл (например, 250-800 пг/мл).

Любое средство, описанное в данном документе (например, полученное из первичных клеток биологическое средство, антагонист PD-1/PD-L1 или антагонист CTLA-4, как описано в данном документе), можно составить в виде фармацевтической композиции. Термин "фармацевтическая композиция" относится к препаратам, которые находятся в такой форме, которая позволяет биологической активности активных ингредиентов быть эффективной. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит средство, как описано в данном документе (например, полученное из первичных клеток биологическое средство, антагонист PD-1/PD-L1 или антагонист CTLA-4, как описано в данном документе), и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой материал, который в сочетании с активным ингредиентом позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и не вступает в реакцию с иммунной системой субъекта. Примеры включают без ограничения любые стандартные фармацевтические носители, такие как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, альбумин, эмульсии, такие как эмульсия масло/вода, и различные типы смачивающих средств. Предпочтительными разбавителями для аэрозольного или парентерального введения являются фосфатно-солевой буфер, нормальный (0,9%) физиологический раствор или 5% декстроза. Композиции, содержащие такие носители, составляют с помощью общеизвестных общепринятых способов (см., например, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

Любое средство, описанное в данном документе (например, полученное из первичных клеток биологическое средство, антагонист PD-1/PD-L1 или антагонист CTLA-4), можно вводить любым подходящим путем, если это необходимо для конкретного состояния, подлежащего лечению. Например, средство, описанное в данном документе (например, полученное из первичных клеток биологическое средство, антагонист PD-1/PD-L1 или антагонист CTLA-4, как описано в данном документе), можно вводить парентерально (например, внутривенно, внутриартериально, внутривнутрибрюшинно, интратекально, интравентрикулярно, интрауретрально, интрастернально, внутривнутричерепно, внутримышечно, внутрикостно, интранодально, внутрикостно и подкожно), перитуморально, интратуморально или перорально. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство, как описано в данном документе, вводят в лимфатический узел или рядом с ним, например, путем перилимфатической инъекции, например, подкожной инъекции или катетеризации в ткань, окружающую дренирующий лимфатический узел, регионарный для опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят подкожно, с помощью катетера, интранодально, перитуморально или перилимфатически. В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство вводят перилимфатически или интранодально в одно или несколько следующих лож лимфатических узлов: подмышечные, шейные, надключичные, подключичные, дельтовидные, паховые, бедренные, средостенные, субпекторальные, внутренние молочных желез и/или забрюшинные ложа лимфатических узлов. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1/PD-L1, как описано в данном документе, вводят внутривенно или перорально. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4, как описано в данном документе, вводят внутривенно. Однако следует понимать, что путь введения средства, описанного в данном документе (например, полученного из первичных клеток биологического средства, антагониста PD-1/PD-L1 или антагониста CTLA-4, как описано в данном документе), может варьироваться в зависимости от типа субъекта, подлежащего лечению, заболевания, подлежащего лечению (например, типа рака), и тяжести заболевания.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, полученное из первичных клеток биологическое средство и/или антагонист PD-1/PD-L1 вводят в качестве неоадьювантной терапии (например, до операции), адьювантной терапии (например, после операции)

или в качестве лечения установленного, рецидивирующего или метастатического заболевания. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, полученное из первичных клеток биологическое средство и/или антагонист CTLA-4 вводят в качестве неоадьювантной терапии (например, до операции), адьювантной терапии (например, после операции) или в качестве лечения установленного, рецидивирующего или метастатического заболевания. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, полученное из первичных клеток биологическое средство, антагонист CTLA-4 и антагонист PD-1/PD-L1 вводят в качестве неоадьювантной терапии (например, до операции), адьювантной терапии (например, после операции) или в качестве лечения установленного, рецидивирующего или метастатического заболевания.

Способ отбора субъектов или оценки вероятности.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам оценки или отбора. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ отбора субъекта для лечения. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) определение уровня PD-L1 и/или CTLA-4 в образце опухоли, полученном от субъекта, имеющего рак или предраковое поражение, и которому было введено полученное из первичных клеток биологическое средство, как описано в данном документе (например, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе, если уровень PD-L1 в образце опухоли выше порогового уровня PD-L1, и/или введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, как описано в данном документе, если уровень CTLA-4 в образце опухоли выше порогового уровня CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение полученного из первичных клеток биологического средства субъекту до этапа определения. В некоторых вариантах осуществления уровень PD-L1 и/или CTLA-4 представляет собой уровень белка. В некоторых вариантах осуществления уровень PD-L1 и/или CTLA-4 представляет собой уровень mRNA.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ оценки вероятности того, что субъект будет восприимчив к антагонисту PD-L1 или PD-1 и/или антагонисту CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение полученного из первичных клеток биологического средства, описанного в данном документе (например, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, при которых экспрессируется первый уровень PD-L1 и/или CTLA-4, который является ниже порогового уровня PD-L1 и/или CTLA-4; и

б) определение второго уровня PD-L1 и/или CTLA-4 в образце опухоли у субъекта после введения полученного из первичных клеток биологического средства, где второй уровень PD-L1 и/или CTLA-4, который выше порогового уровня PD-L1 и/или CTLA-4, является показателем того, что субъект будет восприимчив к антагонисту PD-L1 и/или антагонисту CTLA-4.

Любой подходящий пороговый уровень рассматривается в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень представляет собой уровень PD-L1 (например, уровень белка PD-L1 на клеточных мембранах, таких как мембраны клеток опухоли, мембраны клеток иммунного инфильтрата и/или мембраны стромальных клеток) и/или уровень CTLA-4 в образце опухоли, полученном от субъекта, до введения полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе (например, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение порогового уровня путем измерения уровня PD-L1 и/или CTLA-4 в образце опухоли (например, уровня PD-L1, экспрессируемого клетками опухоли в образце опухоли и/или уровня PD-L1 и/или CTLA-4, экспрессируемого инфильтрирующими иммунными клетками в образце опухоли) от субъекта до введения полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе (например, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ). В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень представляет собой предварительно определенный уровень PD-L1 и/или CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень представляет собой уровень у группы субъектов, например группы субъектов, имеющих рак или предраковые поражения, которые невосприимчивы к антагонисту PD-L1 или PD-1 и/или антагонисту CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень представляет собой отсутствие PD-L1 и/или CTLA-4, например отсутствие PD-L1 и/или CTLA-4 в образце опухоли. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень представляет собой базовое стандартное отклонение вариабельности для анализа, применяемого для измерения уровней PD-L1 и/или CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень PD-L1 представляет собой частичное или полное окрашивание клеточных мембран у 49% жизнеспособных клеток опухоли в образце опухоли. Такой пороговый уровень был ранее описан (Garon et al., N. Engl. J. Med. 2015 May 21; 372(21):2018-28) и может быть определен с применением, например, имеющегося в продаже набора PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako, продукт № SK00621). В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень представляет собой уровень PD-L1 и/или CTLA-4 в образце отрицательного контроля, такого как ткань или клетка, о которых

известно, что они являются отрицательными в отношении PD-L1, например эндотелий, фибробласты и поверхностный эпителий образца ткани миндалина, и/или ткань или клетка, о которых известно, что они являются отрицательными в отношении CTLA-4, например нелимфоидная ткань.

В некоторых вариантах осуществления любого способа, описанного в данном документе, уровень PD-L1 (например, уровень mRNA PD-L1 или уровень белка PD-L1) и/или уровень CTLA-4 (например, уровень mRNA CTLA-4 или уровень белка CTLA-4) измеряют с применением анализа. Любой подходящий анализ предполагается применять для определения уровня PD-L1 и/или CTLA-4. Иллюстративные анализы раскрыты, например, в Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Online Library и других аналогичных базах протоколов. Иллюстративные анализы для определения уровней mRNA PD-L1 и/или CTLA-4 включают нозерн-блоттинг, анализ с защитой от нуклеаз, гибридизацию in situ, RT-qPCR, анализ на микрочипах, мультиплексный анализ экспрессии РНК (например, MultiOmyx™ или с использованием штрихкодированных продуктов, доступных от Nanostring Technologies® или Illumina®) и секвенирование РНК (RNA-seq). Иллюстративные анализы для определения уровней белка PD-L1 и/или CTLA-4 включают иммуногистохимический анализ, проточную цитометрию, мультиплексный анализ белка (например, MultiOmyx™) или анализ вестерн-блоттинга, в котором применяют, например, антитело, специфичное к PD-L1 (такое как моноклональное мышинное антитело к PD-L1, клон 22C3, доступное от Dako), или антитело, специфичное к CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления анализ представляет собой иммуногистохимический анализ, который может быть выполнен с применением набора, например, набора PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako, № продукта SK00621).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов отбора или оценки образец опухоли представляет собой фиксированный формалином образец. Например, образец опухоли фиксируют в формалине и заливают в парафин, образец разрезают, срезы окрашивают DAB (3,3'-диаминобензидин) при помощи моноклонального антитела к PD-L1 (например, моноклонального мышинного антитела 22C3) и/или CTLA-4 и докрасивают гематоксилином, а срезы устанавливают на предметное стекло для оценки. В другом примере образец опухоли фиксируют в формалине и заливают в парафин, образец разрезают, срезы флуоресцентно окрашивают моноклональным антителом к PD-L1 и/или CTLA-4 и срезы анализируют, например, с применением системы PerkinElmer OPAL™. В другом примере образец опухоли фиксируют в формалине и заливают в парафин, образец разрезают, срезы флуоресцентно окрашивают моноклональным антителом к PD-L1 и/или CTLA-4, необязательно в комбинации с окрашиванием другими биомаркерами, и срезы анализируют, например, с применением системы MultiOmyx™, доступной от NeoGenomics Laboratories.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов отбора или оценки субъекта подвергают лечению с помощью антагониста PD-1 или PD-L1, как описано в данном документе, если субъект выбран или оценка указывает, что субъект, вероятно, восприимчив к антагонисту PD-1 или PD-L1, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любого из способов отбора или оценки субъекта подвергают лечению с помощью антагониста CTLA-4, как описано в данном документе, если субъект выбран или оценка указывает, что субъект, вероятно, восприимчив к антагонисту CTLA-4, как описано в данном документе.

Субъекты.

В способах, описанных в данном документе, используют субъектов, таких как субъекты, имеющие или предположительно имеющие рак или предраковое поражение. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-млекопитающее, такой как человек, имеющий или предположительно имеющий рак или предраковое поражение. Другие иллюстративные субъекты включают приматов, отличных от человека, свиней, лошадей, овец, коров, кроликов, собак, кошек, крыс и мышей.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется опухоль, которая экспрессирует определенный уровень PD-L1. В некоторых вариантах осуществления опухоль не экспрессирует PD-L1. В некоторых вариантах осуществления опухоль экспрессирует уровень PD-L1, который является ниже порогового уровня, как описано в данном документе (например, частичное или полное окрашивание клеточных мембран у 49% жизнеспособных клеток опухоли в образце опухоли).

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется опухоль, которая содержит инфильтрирующие иммунные клетки, экспрессирующие определенный уровень PD-L1 и/или CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления инфильтрирующие иммунные клетки не экспрессируют PD-L1 и/или CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект, имеющий рак, такой как человек, имеющий рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) или мелкоклеточный рак легкого (SCLC)), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака (CRC), рака почки, рака желудка, рака молочной железы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), гематологических злокачественных новообразований (например, острого миелогенного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы), рака поджелудочной железы, рака

мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (H&NSCC, также называемой SCCHN), рака мочеполовой системы, прогрессирующей кожной плоскоклеточной карциномы, метастазов в печени, мезотелиомы, гастроэзофагеального рака, карциномы из клеток Меркеля и уротелиальной карциномы. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 или PD-L1 выбран из приведенной ниже таблицы, и рак в приведенной ниже таблице представляет собой рак для выбранного антагониста PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 выбран из приведенной ниже таблицы, и рак в приведенной ниже таблице представляет собой рак для выбранного антагониста CTLA-4.

Антагонист PD-1	Иллюстративные виды рака
Ниволумаб (OPDIVO®)	Меланома, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), почечно-клеточный рак (RCC), рак предстательной железы, лимфома Ходжкина, рак яичника, колоректальный рак (CRC), рак мочеполовой системы, рак почки, рак желудка, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом
Пидилизумаб (CT-011)	Меланома, фолликулярная лимфома (FL), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), гематологические злокачественные новообразования (AML, NHL, MM, CLL, лимфома Ходжкина), рак поджелудочной железы
Пембролизумаб (KEYTRUDA®)	Меланома, NSCLC, рак мочевого пузыря, лимфома Ходжкина, рак молочной железы, рак желудка, плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN), рак мочеполовой системы, уротелиальная карцинома
MEDI-0680	Меланома, светлоклеточный RCC, В-клеточная лимфома
REGN2810	Прогрессирующая кожная плоскоклеточная карцинома, лимфома
AMP-224	Солидная злокачественная опухоль или кожная Т-клеточная лимфома, меланома, рак яичника, колоректальный рак
Антагонист PD-L1	Иллюстративные виды рака
Атезолизумаб (TECENTRIQ™)	Меланома, NSCLC, SCLC, RCC, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак мочеполовой системы, лимфома, множественная миелома, новообразования почки, рак головы и шеи, рак яичника, колоректальный рак, уротелиальная карцинома
Дурвалумаб (IMFINZI™)	NSCLC, SCCHN, колоректальный рак, метастазы в печень, рак желудка, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, мезотелиома, лимфома, рак легкого, меланома, гастроэзофагеальный рак, рак яичника, уротелиальная карцинома
BMS-936559	Меланома, NSCLC, RCC, рак яичника, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, множественная миелома, хронический миелогенный лейкоз
Авелумаб (BAVENCIO®)	RCC, NSCLC, рак желудка, лимфома Ходжкина, рак яичника, уротелиальная карцинома, карцинома из клеток Меркеля
CA-170	Прогрессирующие солидные опухоли, прогрессирующие лимфомы, меланома, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточная карцинома, лимфома Ходжкина, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак желудка, рак мочевого пузыря и рак яичника
Антагонист CTLA-4	Иллюстративные виды рака

Ипилимумаб (YERVOY®)	Метастатическая меланома, рак легкого, рак предстательной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичника, уротелиальная карцинома
Тремелимуаб	Рак легкого, В-клеточная лимфома, рак желудка, рак мочевого пузыря, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, лейкоз ворсистых клеток, мезотелиома, меланома, рак молочной железы, почечно-клеточная карцинома, рак яичника, гепатоцеллюлярный рак, колоректальный рак

В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект, имеющий предраковое поражение, такой как человек, имеющий предраковое поражение. В некоторых вариантах осуществления предраковое поражение выбрано из группы, состоящей из интраэпителиальной неоплазии шейки матки (CIN, например, CENT III степени) и интраэпителиальной неоплазии влагалища (VIN, например VIN III степени).

В некоторых вариантах осуществления субъект является невосприимчивым к лечению, например, лечению антагонистом PD-1 или PD-L1, как описано в данном документе, и/или антагонистом CTLA-4, как описано в данном документе. Субъект может быть невосприимчивым к лечению, если состояние, например, рак, является устойчивым к лечению или становится устойчивым к лечению с течением времени (например, субъект может быть восприимчивым к антагонисту PD-1 или PD-L1 и/или антагонисту CTLA-4, как описано в данном документе, и стать устойчивым к антагонисту с течением времени). В некоторых вариантах осуществления субъект становится восприимчивым к лечению после введения полученного из первичных клеток биологического средства, как описано в данном документе.

Наборы.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к наборам, таким как наборы, подходящие для осуществления способа, описанного в данном документе, например, лечения рака или предракового поражения. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий полученное из первичных клеток биологическое средство, как описано в данном документе (например, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), и антагонист PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе (например, ниволумаб, пидилизумаб, пембролизумаб, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаб, дурвалумаб, BMS-936559, авелумаб или CA-170). В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий полученное из первичных клеток биологическое средство, как описано в данном документе (например, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), и антагонист CTLA-4, как описано в данном документе (например, ипилимумаб или тремелимуаб). В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий полученное из первичных клеток биологическое средство, как описано в данном документе (например, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), антагонист PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе (например, ниволумаб, пидилизумаб, пембролизумаб, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаб, дурвалумаб, BMS-936559, авелумаб или CA-170), и антагонист CTLA-4, как описано в данном документе (например, ипилимумаб или тремелимуаб).

В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство предусмотрено в одном или нескольких первых комплектах контейнеров, а антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 предусмотрен в одном или нескольких вторых комплектах контейнеров. В некоторых вариантах осуществления один или несколько первых комплектов контейнеров содержат терапевтически эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства для лечения рака или предракового поражения, и один или несколько вторых комплектов контейнеров содержат терапевтически эффективное количество антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 для лечения рака или предракового поражения. В некоторых вариантах осуществления один или несколько первых комплектов контейнеров содержат концентрированное количество полученного из первичных клеток биологического средства, которое можно разбавить на месте для введения субъекту или можно ввести поправку на меньший объем полученного из первичных клеток биологического средства, подлежащего введению субъекту (например, терапевтически эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, описанного в данном документе, можно концентрировать в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз, 1000 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления полученное из первичных клеток биологическое средство, антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 замораживают или лиофилизируют.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции для осуществления способа, как описано в данном документе, например, для лечения рака или предракового поражения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько устройств доставки для введения полученного из первичных клеток биологического средства, антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4, таких как шприц или катетер.

Комбинации цитокинов.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению комбинации цитокинов (вводимых отдельно или вместе, например, в форме смеси цитокинов), например, согласно способу или в композиции, как описано в данном документе. Комбинация цитокинов может предусматривать IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ и TNF- α (например, IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, IFN- γ человека и TNF- α человека), которые могут включать в себя природные, рекомбинантные или пегелированные цитокины или смесь природных, рекомбинантных или пегелированных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов может дополнительно включать другие природные, рекомбинантные или пегелированные цитокины, такие как GM-CSF и G-CSF (например, GM-CSF и G-CSF человека). В некоторых вариантах осуществления цитокины можно пегелировать для того, чтобы увеличить период полужизни цитокина *in vivo* и/или снизить иммуногенность или токсичность белка цитокина *in vivo* (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0136952).

Ниже представлены иллюстративные последовательности зрелых белков цитокинов человека, которые можно использовать для получения цитокинов, таких как рекомбинантные или пегелированные цитокины, для включения в комбинацию цитокинов. Способы получения комбинаций цитокинов, таких как смеси цитокинов, содержащие природные, рекомбинантные и/или пегелированные цитокины, известны из уровня техники (см., например, патенты США № 4738927, 4992367, публикацию заявки на патент США № 2004/0136952 A1 и Mehvar, Modulation of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Proteins by Polyethylene Glycol Conjugation, J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 3(1):125-136 (2000)).

IL-1 β человека:

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQQVVFMSFSVQGEES
NDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKMKMEKRFVFNKIEINNK
LEFESAQFPNWIYSTQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS (SEQ ID NO: 1)

IL-2 человека:

LSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML
TFKFMPPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS
ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS (SEQ ID NO: 2)

IL-6 человека:

VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKE
ALAENNLNLPKMAEKDGFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFSSEEQAR
AVQMSTKVLQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSF
KEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO: 3)

IL-8 человека:

EGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRE
LCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS (SEQ ID NO: 4)

IFN- γ человека:

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSF
YFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKA
IHELIQVMAELSPAAGTKGRKRSQMLFRG (SEQ ID NO: 5)

TNF- α человека:

PVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQV
LFGKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPQRETPEGAEAKPWYEPYILG
GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGII (SEQ ID NO: 6)

В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) содержит по меньшей мере 1 МЕ (например, по меньшей мере 1 МЕ, по меньшей мере 2 МЕ или по меньшей мере 3 МЕ) каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и IFN- γ , например IL-1 β человека, IL-2 человека, IL-6 человека, IL-8 человека, TNF- α человека и IFN- γ человека. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и при этом комбинация цитокинов содержит по меньшей мере 0,05 МЕ (например, по меньшей мере 0,05 МЕ, по меньшей мере 0,1 МЕ или по меньшей мере 1 МЕ) GM-CSF и по меньшей мере 1 МЕ (например, по меньшей мере 1 МЕ, по меньшей мере 2 МЕ или по меньшей мере 3 МЕ) G-CSF.

В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) содержит каждый цитокин в соотношении относительно количеством доставляемого IL-2. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) предусматривает соотношение МЕ IL-1 β (например, МЕ IL-1 β человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека) от 0,45 до 1,37 (например, от 0,45 до 0,94); соотношение МЕ IFN- γ (например, МЕ IFN- γ человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека) от 0,19 до 0,39 (например,

от 0,19 до 0,34); соотношение МЕ TNF- α (например, МЕ TNF- α человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека) от 0,53 до 1,26 (например, от 0,53 до 0,96); соотношение МЕ IL-6 (например, МЕ IL-6 человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека) от 1,16 до 6,06 (например, от 1,32 до 3,35) и соотношение МЕ IL-8 (например, МЕ IL-8 человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека) от 0,15 до 0,51 (например, от 0,15 до 0,41).

В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например, GM-CSF человека и G-CSF человека, и количество комбинации, доставляемой субъекту, предусматривает соотношение МЕ G-CSF (например, МЕ G-CSF человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,11 до 0,95 (например, от 0,11 до 0,54), и соотношение МЕ GM-CSF (например, МЕ GM-CSF человека) к МЕ IL-2 (например, МЕ IL-2 человека), составляющее от 0,002 до 0,06 (например, от 0,03 до 0,04). В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) содержит 22-657 МЕ (например, 30-147 МЕ) IL-1 β , например IL-1 β человека; 29-478 МЕ (например, 67-156 МЕ) IL-2, например IL-2 человека; 10-185 МЕ (например, 13-53 МЕ) IFN- γ , например IFN- γ человека; 29-600 МЕ (например, 36-150 МЕ) TNF- α , например TNF- α человека; 34-2895 МЕ (например, 89-524 МЕ) IL-6, например IL-6 человека; и 5-244 МЕ (например, 10-64 МЕ) IL-8, например IL-8 человека. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например, GM-CSF человека и G-CSF человека, и данная комбинация цитокинов содержит 7-456 МЕ (например, 7-84 МЕ) G-CSF и 0,08-28 МЕ (например, 2-6 МЕ) GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 22-657 МЕ/мл (например, 30-147 МЕ/мл); концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 29-478 МЕ/мл (например, 67-156 МЕ/мл); концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 10-185 МЕ/мл (например, 13-53 МЕ/мл); концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 29-600 МЕ/мл (например, 36-150 МЕ/мл); концентрацию IL-6, например IL-6 человека, в диапазоне 34-2895 МЕ/мл (например, 89-524 МЕ/мл); и концентрацию IL-8, например IL-8 человека, в диапазоне 5-244 МЕ/мл (например, 10-64 МЕ/мл).

В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например GM-CSF человека и G-CSF человека, и данная комбинация цитокинов предусматривает концентрацию G-CSF в диапазоне 7-456 МЕ/мл (например, 7-84 МЕ/мл) и концентрацию GM-CSF в диапазоне 0,08-28 МЕ/мл (например, 2-6 МЕ/мл).

В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) содержит 220-6700 пг (например, 310-1500 пг) IL-1 β , например IL-1 β человека; 1730-28100 пг (например, 3960-9200 пг) IL-2, например IL-2 человека; 560-10900 пг (например, 750-3100 пг) IFN- γ , например IFN- γ человека; 580-12000 пг (например, 720-3000 пг) TNF- α , например TNF- α человека; 260-22100 пг (например, 680-4000 пг) IL-6, например IL-6 человека; и 4610-243600 пг (например, 10390-63800 пг) IL-8, например IL-8 человека. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например, GM-CSF человека и G-CSF человека, и данная комбинация цитокинов содержит 60-3800 пг (например, 60-700 пг) G-CSF и 10-3500 пг (например, 250-800 пг) GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 300-1400 пг/мл; концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 4000-8000 пг/мл; концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 1000-3800 пг/мл и концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 1000-4300 пг/мл.

В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) предусматривает концентрацию IL-1 β , например IL-1 β человека, в диапазоне 220-6700 пг/мл (например, 310-1500 пг/мл); концентрацию IL-2, например IL-2 человека, в диапазоне 1730-28100 пг/мл (например, 3960-9200 пг/мл); концентрацию IFN- γ , например IFN- γ человека, в диапазоне 560-10900 пг/мл (например, 750-3100 пг/мл); концентрацию TNF- α , например TNF- α человека, в диапазоне 580-12000 пг/мл (например, 720-3000 пг/мл); концентрацию IL-6, например IL-6 человека, в диапазоне 260-22100 пг/мл (например, 680-4000 пг/мл); и концентрацию IL-8, например IL-8 человека, в диапазоне 4610-243600 пг/мл (например, 10390-63800 пг/мл). В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (которые можно доставлять отдельно или вместе) дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF, например, GM-CSF человека и G-CSF человека, и данная комбинация цитокинов предусматривает концентрацию G-CSF в диапазоне 60-3800 пг/мл (например, 60-700 пг/мл) и концентрацию GM-CSF в диапазоне 10-3500 пг/мл (например, 250-800 пг/мл).

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения, например, лечения рака или предракового поражения, с применением комбинации цитокинов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества комбинации цитокинов, как описано в данном документе (например, содержащей ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества комбинации цитокинов, как описано в данном документе (например, содержащей ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает:

а) введение субъекту, имеющему рак или предраковое поражение, эффективного количества комбинации цитокинов, как описано в данном документе (например, содержащей ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, TNF- α и IFN- γ); и

б) введение субъекту эффективного количества антагониста CTLA-4, как описано в данном документе, и эффективного количества антагониста PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления введение комбинации цитокинов и антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 происходит отдельно во времени и/или их вводят в разных местоположениях у субъекта (например, различными путями введения). В некоторых вариантах осуществления способа, когда антагонист PD-L1 или PD-1 и антагонист CTLA-4 используют в комбинации, антагонист PD-L1 или PD-1 и антагонист CTLA-4 вводят совместно. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 или PD-1 и антагонист CTLA-4 вводят раздельно во времени.

В некоторых вариантах осуществления комбинацию цитокинов и антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 вводят в один и тот же день, но в разных местоположениях у субъекта (например, различными путями введения). В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 или PD-1 вводят внутривенно или перорально. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления комбинацию цитокинов вводят подкожно, с помощью катетера, интранодально, перитуморально, интратуморально или перилимфатически (например, путем подкожной инъекции или катетеризации в ткань, окружающую лимфатический узел).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят по меньшей мере до одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу комбинации цитокинов вводят по меньшей мере до одной дозы антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу комбинации цитокинов вводят по меньшей мере до одной дозы антагониста CTLA-4 и по меньшей мере одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят после по меньшей мере одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу комбинации цитокинов вводят после по меньшей мере одной дозы антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу комбинации цитокинов вводят после по меньшей мере одной дозы антагониста CTLA-4 и по меньшей мере одной дозы антагониста PD-L1 или PD-1.

В некоторых вариантах осуществления введение комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) осуществляют как до, так и после антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления введение комбинации цитокинов осуществляют как до, так и после антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления комбинации цитокинов осуществляют как до, так и после антагониста CTLA-4 и антагониста PD-L1 или PD-1. В некоторых вариантах осуществления введение антагониста PD-L1 или PD-1 осуществляют как до, так и после комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов). В некоторых вариантах осуществления введение антагониста CTLA-4 осуществляют как до, так и после комбинации цитокинов. В некоторых вариантах осуществления введение антагониста CTLA-4 и антагониста PD-L1 или PD-1 осуществляют как до, так и после комбинации цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления введение комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) и антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 происходит в течение нескольких циклов. В некоторых вариантах осуществления комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят в течение одного или нескольких 10-дневных циклов, таких как введение один раз в день в течение 10 дней, где 10 дней являются последовательными или могут включать один или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или 5) дней, когда биологическое средство не доставляют, например, во время выходного дня.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько 10-дневных циклов являются частью одного или нескольких 21-дневных циклов с использованием несколько средств. В некоторых вариантах

осуществления в течение каждого 21-дневного цикла циклофосфамид вводят на 1-й день (например, внутривенно в дозе 300 мг/м²); индометацин (например, 25 мг перорально три раза в день), омепразол (например, 20 мг перорально) и цинк (например, от 15 до 30 мг перорально) вводят ежедневно в течение 21 дня, и комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов), как описано в данном документе (например, содержащую IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), вводят ежедневно в течение 10 дней (например, последовательно или в виде двух 5-дневных блоков с одним или несколькими днями между ними), начиная с 4-го дня каждого цикла.

В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 или PD-1 вводят в течение одного или нескольких 2-4-недельных циклов, где введение антагониста осуществляют раз в две-четыре недели в течение каждого цикла (например, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели за цикл). В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 вводят в течение одного или нескольких 3-12-недельных циклов, где введение антагониста осуществляют раз в 3-12 недель (например, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в восемь недель или раз в двенадцать недель).

В некоторых вариантах осуществления в способе, описанном в данном документе, применяют схему введения дозы, где комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят в течение 10-дневного цикла, как описано выше (необязательно в виде части 21-дневного цикла, описанного выше), а антагонист PD-L1 или PD-1 вводят в течение 2-4-недельного цикла, как описано выше, где схему введения дозы повторяют по меньшей мере один раз (например, повторяют 1, 2, 3 или 4 раза в год). В некоторых вариантах осуществления схемы комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят до антагониста PD-L1 или PD-1. В других вариантах осуществления схемы антагонист PD-L1 или PD-1 вводят до комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов).

В некоторых вариантах осуществления в способе, описанном в данном документе, применяют схему введения дозы, где комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят в течение цикла продолжительностью до 10 дней, как описано выше (необязательно в виде части 21-дневного цикла, описанного выше), а антагонист CTLA-4 вводят в течение трехдвенадцатинедельного цикла, как описано выше, где схему введения дозы повторяют по меньшей мере один раз (например, повторяют 1, 2, 3 или 4 раза в год). В некоторых вариантах осуществления схемы комбинацию цитокинов вводят до антагониста CTLA-4. В других вариантах осуществления схемы антагонист CTLA-4 вводят до полученного из первичных клеток биологического средства.

В некоторых вариантах осуществления в способе, описанном в данном документе, применяют схему введения дозы, где комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) вводят в течение цикла продолжительностью до 10 дней, как описано выше (необязательно в виде части 21-дневного цикла, описанного выше), антагонист CTLA-4 вводят в течение 3-12-двенадцатинедельного цикла, как описано выше, и антагонист PD-L1 или PD-1 вводят в течение двух-четырёхнедельного цикла, как описано выше, где схему введения дозы повторяют по меньшей мере один раз (например, повторяют 1, 2, 3 или 4 раза в год). В некоторых вариантах осуществления схемы комбинацию цитокинов вводят до антагониста CTLA-4 и антагониста PD-L1 или PD-1. В других вариантах осуществления схемы антагонист CTLA-4 и антагонист PD-L1 или PD-1 вводят до комбинации цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов), как описано в данном документе (например, содержащую IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), и антагонист PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе (например, ниволумаб, пидилизумаб, пембролизумаб, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаб, дурвалумаб, BMS-936559, авелумаб или CA-170). В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов), как описано в данном документе (например, содержащую IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ), и антагонист CTLA-4, как описано в данном документе (например, ипилимумаб или тремелимуаб). В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор, содержащий комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов), антагонист PD-L1 или PD-1, как описано в данном документе (например, ниволумаб, пидилизумаб, пембролизумаб, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаб, дурвалумаб, BMS-936559, авелумаб или CA-170), и антагонист CTLA-4, как описано в данном документе (например, ипилимумаб или тремелимуаб). В некоторых вариантах осуществления комбинация цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) предусмотрена в одном или нескольких первых комплектах контейнеров, а антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 предусмотрен в одном или нескольких вторых комплектах контейнеров. В некоторых вариантах осуществления один или несколько первых комплектов контейнеров содержат терапевтически эффективное количество комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов) для лечения рака или предракового поражения, и один или несколько вторых комплектов контейнеров содержат терапевтически эффективное количество антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4 для лечения рака или предракового поражения. В некоторых

вариантах осуществления комбинацию цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов), антагонист PD-L1 или PD-1 и/или антагонист CTLA-4 замораживают или лиофилизируют. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции для осуществления способа, как описано в данном документе, например, для лечения рака или предракового поражения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько устройств доставки для введения комбинации цитокинов (либо отдельно, либо совместно, например, в виде смеси цитокинов), антагониста PD-L1 или PD-1 и/или антагониста CTLA-4, таких как шприц или катетер.

Без дополнительного уточнения считается, что специалист в данной области техники может на основании приведенного выше описания применять настоящее изобретение в его полной мере. Следующие конкретные варианты осуществления, следовательно, должны рассматриваться как просто иллюстративные и никоим образом не ограничивающие остальную часть настоящего изобретения. Все публикации, процитированные в данном документе, включены посредством ссылки для целей или объекта, упоминаемых в данном документе.

Примеры

Пример 1. Полученное из первичных клеток биологическое средство увеличивает инфильтрацию лимфоцитов и экспрессию PD-L1.

Лечение рака в последнее время усовершенствовали с появлением иммунотерапии рака. Ингибиторы контрольных точек (CI) в настоящее время представляют собой принципиально новый метод лечения рака наряду с более устоявшимися методами хирургии, радиотерапии и химиотерапии и предлагают новую терапевтическую надежду для многих пациентов. Пембролизумаб и ниволумаб были одобрены в качестве терапии первой линии в отношении метастатической меланомы, метастатической меланомы, для которой была неэффективной терапия ингибитором V-raf или ипилимумабом, и для лечения немелкоклеточного рака легкого, для которого была неэффективной терапия на основе платины. Недавно пембролизумаб был одобрен в качестве терапии второй линии для лечения рака почки, а атезолизумаб (TECENTRIQ™) был первым ингибитором PD-L1, одобренным для рака мочевого пузыря. Дурвалумаб также получил важное назначение в отношении неоперабельного или рецидивирующего метастатического рака мочевого пузыря.

IRX-2 представляет собой полученное из первичных клеток биологическое средство с несколькими цитокиновыми компонентами, полученными из моноклеарных клеток периферической крови доноров, стимулированных сильным иммуногеном (PHA). Биологическое средство IRX-2 содержит несколько цитокинов, включающих IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ , которые работают вместе синергически с получением сильного иммунного ответа. IRX-2 оказывает множественные эффекты в отношении различных клеток иммунной системы, в том числе активацию и усиление презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, увеличение пролиферации и цитолитической способности Т-клеток и защиту их от апоптоза, а также увеличение количества и активности NK-клеток (Egan et al. (2007), *J. Immunother.* 30(6):624-633; Czystowska et al. (2009), *Cell Death Differ.* 16(5):708-718; Czystowska et al. (2011), *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 60(4):495-506; Schilling et al. (2012), *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 61(9):1395-1405; Schilling et al. (2013), *PLoS One*, 8(2):e47234; и Schilling et al. (2012), *J. Mol. Med. (Berl)*, 90(2): 139-147)). В клинике показано, что схема с IRX-2 (в которой используется IRX-2, циклофосфамид, индометацин и цинк) безопасна с благоприятным профилем токсичности (Freeman et al. (2011), *Am. J. Clin. Oncol.* 34(2):173-178). Важное клиническое подтверждение концепции было получено при подробном анализе образцов опухоли до и после лечения в многоцентровом испытании фазы 2а, где увеличение инфильтрации лимфоцитов после схемы с IRX-2 было отмечено у 21 из 25 оцениваемых пациентов (Berinstein et al. (2012), *Cancer immunology, immunotherapy. Increased lymphocyte infiltration in patients with head and neck cancer treated with the IRX-2 immunotherapy regimen.* 61(6):771-782).

Анализировали ретроспективно 7 субъектов, которых лечили в вышеупомянутом испытании фазы 2а, на предмет экспрессии дополнительных биомаркеров для характеристики инфильтрата и выяснения механизмов подавления в микроокружении опухоли, которые могут дать информацию для иммунных вмешательств, которые могут обеспечивать усиление специфического в отношении опухоли иммунного ответа. Схема с IRX-2 (как показано в таблице. ниже), назначенная субъектам, представляла собой 21-дневную схему, включающую IRX-2 ежедневно в течение 10 дней между 4- и 15-м днями, циклофосфамид в 1-й день и индометацин, цинк и ингибитор протонного насоса в дни 1-21.

Средство	Доза	Путь введения	Дни лечения
IRX-2	230 единиц в день Билатеральн ые инъекции 115 единиц	Подкожно	Любые десять дней между 4-м и 15-м днями (например, дни 4-8 и 11-15)
Циклофосфамид	300 мг/м ²	IV	1
Индометацин	25 мг TID	Перорально	1-21
Содержащие цинк мультивитамины	1 таб.	Перорально	1-21
Ингибитор протонного насоса	Терапевтиче ская доза	Перорально	1-21

Дозировку IRX-2 определяли по присутствию 115 Международных единиц IL-2 (МЕ) в дозе, доставляемой субъекту при каждой инъекции.

Образцы фиксированной в формалине и залитой парафином (FFPE) биопсии пациентов (до лечения с IRX-2) сравнивали с образцами первичной резекции опухоли (после лечения с IRX-2) и окрашивали в отношении маркеров, включающих в себя CD4, CD8, PD-L1, CD68, FoxP3 и цитокератин, с применением системы PerkinElmer OPAL™. Для окрашивания в отношении экспрессии PD-L1 использовали кроличье моноклональное антитело клон SP142 от Spring Bio. Экспрессию PD-L1 измеряли на клеточных мембранах и приводили как среднюю нормализованную флуоресценцию. Устанавливали параметры рейтинга для идентификации четырех уровней (категорий) мембранной флуоресценции для популяций клеток PD-L1 в опухолевой ткани. Используя эти параметры рейтинга, клеткам опухоли присваивали одну из четырех категорий экспрессии PD-L1 (0-3+). Результаты представляли в виде гистограмм и использовали при вычислении H-показателя для PD-L1 в опухоли. Среднюю мембранную интенсивность PD-L1 также приводили для CD68⁺ клеток в опухолевых и неопухолевых сегментах ткани.

Анализ 7 подходящих пациентов методом мультиплексной иммуногистохимии (IHC) подтвердил предыдущие результаты с применением окрашивания H&E, что лечение с IRX-2 приводило к увеличению инфильтрации лимфоцитов (LI), а также к увеличению инфильтрации макрофагов (на фиг. 1 показан один иллюстративный пациент).

Затем эту систему применяли для оценки экспрессии и изменений экспрессии пути контрольной точки PD-L1. У 4 из 7 пациентов наблюдалось показатели значительного повышения PD-L1 после лечения с помощью IRX-2 (фиг. 2). Таким образом, IRX-2 увеличивает инфильтрацию лимфоцитов и экспрессию PD-L1, позволяя предположить, что схема с использованием IRX-2 может обеспечивать иницирование специфического в отношении опухоли иммунного ответа.

Хотя результаты с ингибиторами контрольной точки для ряда различных типов опухолей являются многообещающими и предоставили подтверждение концепции для иммунотерапевтических подходов, было достигнуто плато, при котором только около 20-30% пациентов, получавших лечение, получают пользу от подавления контрольной точки. Обеспечили дополнительное повышение пользы путем объединения различных ингибиторов контрольных точек, но, к сожалению, этот подход связан с повышением профиля токсичности (Postow et al. (2015), *The New England Journal of Medicine*, 372(21):2006-2017). Биомаркеры ответа, такие как экспрессия LI, PD-L1, мутационная нагрузка и состояние ферментов репарации несоответствия, применяли для отбора пациентов с большей вероятностью ответа (Rizvi et al. (2015), *Cancer immunology. Science*, 348(6230):124-128; Garon et al. (2015), *The New England Journal of Medicine*, 372(21):2018-2028; и Le et al. (2015), *The New England Journal of Medicine*, 372(26):2509-2520). Тем не менее основная задача заключается в разработке стратегий для увеличения экспрессии PD-L1 в опухоли, поскольку экспрессия PD-L1 в опухоли, по-видимому, является единственным наиболее важным фактором для клинического исхода у пациентов, получавших лечение с помощью таких ингибиторов (см., например, Taube et al., *Clin Cancer Res*; 20(19):5064-74 (2014); Sunshine and Taube, *Current Opinion in Pharmacology*, 23:32-38 (2015); и Carbognin et al., *PLoS ONE*, 10(6):e0130142. (2015)). Приведенные в данном документе данные показывают, что экспрессия PD-L1 была увеличена у нескольких пациентов после введения IRX-2. Это говорит о том, что применение ингибитора PD-1/PD-L1 после ле-

чения с IRX-2 может повысить терапевтическую активность ингибитора PD-1/PD-L1 и/или увеличить популяцию пациентов, способных отвечать на подавление PD-1/PD-L1.

Пример 2. Полученное из первичных клеток биологическое средство увеличивает экспрессию CTLA-4 7 субъектов, получавших лечение в фазе 2а испытания, описанного в примере 1 выше, также подвергали ретроспективному анализу в отношении экспрессии CTLA-4.

Образцы фиксированной в формалине и залитой парафином (FFPE) биопсии пациентов (до лечения с IRX-2) сравнивали с образцами первичной резекции опухоли (после лечения с IRX-2). Одно предметное стекло FFPE-ткани окрашивали гематоксилином и эозином (HE) и подвергали изучению патологом для определения области опухоли. Среднее содержание опухолевых клеток составляло 60% (минимум 30%). miRNA или общую РНК выделяли из области опухоли срезов толщиной 5 мкм с помощью набора для выделения High Pure microRNA FFPE (Roche, Базель, Швейцария) или набора High Pure FFPE RNA Micro (Roche) в соответствии с протоколами производителя. Вкратце, срезы тканей сначала депарафинизировали ксилолом и промывали этанолом. Затем ткани лизировали и обрабатывали протеиназой К в течение 3 ч при 55°C. После этого лизаты применяли на спин-колонках и после стадии промывки miRNA элюировали в 50 мкл элюирующего буфера. Общую РНК дважды элюировали в 40 мкл элюирующего буфера. После этого РНК очищали и концентрировали с применением набора Clean&Concentrator-5™ (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя. Выход РНК измеряли с помощью NanoDrop™ 2000 (Implen GmbH, Мюнхен, Германия) или набора для анализа Qubit® RNA BR (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) на флуориметре Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Качество РНК определяли на биоанализаторе Lab-on-a-Chip 2100 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Поскольку РНК из FFPE-материала может обладать низким качеством (значения REST<2), образцы не исключали только на основании значений RIN (число целостности РНК). Уровни mRNA CTLA-4 относительно общей РНК измеряли с применением панели иммунного профилирования NCounter® PanCancer (Nanostring Technologies, Сिएтл, Вашингтон, США) в соответствии со спецификациями производителя.

Затем эту систему применяли для оценки экспрессии и изменений экспрессии пути контрольной точки CTLA-4. У 5 из 7 пациентов наблюдалось значительное повышение экспрессии гена CTLA-4 после лечения с помощью IRX-2 (фиг. 3). Таким образом, IRX-2 обеспечивает увеличение экспрессии CTLA-4, еще раз подтверждая, что схема с применением IRX-2 может обеспечивать инициирование функционального специфичного в отношении опухоли иммунного ответа и физиологическую индукцию иммунорегуляторного пути CTLA4.

Ранее было показано, что повышенные уровни CTLA-4 до лечения предсказывают положительный клинический ответ на блокаду CTLA4 (см., например, Jamieson et al., Gene-expression profiling to predict responsiveness to immunotherapy. Cancer Gene Therapy (2017), 24:134-140 и Van Allen et al., Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. Science (2015), 350(6257):207-211). Приведенные в данном документе данные показывают, что экспрессия CTLA-4 была увеличена у нескольких пациентов после введения IRX-2. Это говорит о том, что применение ингибитора CTLA-4 после лечения с помощью IRX-2 может обеспечивать повышение терапевтической активности ингибитора CTLA-4 и/или увеличение популяции пациентов, способных отвечать на подавление CTLA-4.

Другие варианты осуществления

Все признаки, раскрытые в данном описании, можно объединить в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в данном описании, можно заменить альтернативным признаком, служащим аналогичной, эквивалентной или сходной цели. Таким образом, если прямо не указано иное, каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или сходных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения и, не отклоняясь от его идеи и объема, может осуществлять различные изменения и модификации в настоящем изобретении, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

Эквиваленты.

В то время как несколько вариантов осуществления настоящего изобретения были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалисты в данной области техники легко предвидят множество других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, описанных в данном документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. В целом, специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которого/которых используют идеи настоящего изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, или они способны определить с применением лишь обычного экспериментирования наличие многих эквивалентов конкретных вариантов осуществления

настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, необходимо понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут применяться на практике иначе, чем конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения в соответствии с настоящим изобретением направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, включена в объем настоящего изобретения в соответствии с настоящим изобретением.

Все определения, как они определены и используются в данном документе, следует понимать с наличием преимущества над словарными определениями, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычных значений определенных терминов.

Все ссылки, патенты и заявки на патент, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении объекта, для которого каждая из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и в формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие "по меньшей мере один".

Фраза "и/или", используемая в данном документе в описании и в формуле изобретения, должна пониматься как означающая "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в некоторых случаях присутствуют совместно, а в других случаях присутствуют отдельно. Несколько элементов, перечисленных с "и/или", должны толковаться одинаковым образом, т.е. "один или несколько" элементов, объединенных таким образом. Другие элементы могут необязательно присутствовать, помимо элементов, конкретно указанных с помощью условия "и/или", независимо от того, связаны ли они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с ничем не ограниченным выражением, например "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как для А, так и для В (необязательно включая другие элементы); и т.д.

Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения термин "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в списке "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающие, т.е. с включением по меньшей мере одного, но также включая более чем один из числа или списка элементов и необязательно дополнительные не перечисленные пункты. Только термины, четко обозначенные как противоположные, такие как "только один из" или "точно один из", или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению точно одного элемента из числа или списка элементов. В общем термин "или", используемый в данном документе, должен толковаться только как указывающий на исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "либо", "один из", "только один из" или "точно один из". Термин "состоящий по существу из" при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемое в данном документе в описании и формуле изобретения выражение "по меньшей мере один" в отношении списка из одного или нескольких элементов следует понимать как означающее по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в списке элементов, но необязательно включающее в себя по меньшей мере один из каждого и каждый элемент, конкретно указанный в списке элементов, и не исключающее любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно определенных в списке элементов, на которые ссылается фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или эквивалентно "по меньшей мере один из А или В", или эквивалентно "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, А без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, В без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, А и по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, В (и необязательно включая другие элементы), и т.п.

Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в данном документе способах, которые включают в себя более одного этапа или действия, порядок этапов или действий способа не обязательно ограничен порядком, в котором эти этапы или действия способа изложены.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как

"включающий", "включающий в себя", "несущий", "имеющий", "содержащий", "задействующий", "содержащий в себе", "составленный из" и тому подобное следует понимать как открытые, т. е. означающие включение, но без ограничения. Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий по существу из" должны быть закрытыми или полужакрытыми переходными фразами соответственно, как указано в Руководстве по проведению патентной экспертизы Патентного ведомства США, раздел 2111.03.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает:
 - а) введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ ; и
 - б) введение субъекту эффективного количества антагониста лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) или белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1), где введение полученного из первичных клеток биологического средства и введение антагониста осуществляют в разных местоположениях у субъекта и/или в разные моменты времени, где полученное из первичных клеток биологическое средство предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51.
2. Способ по п.1, где:
 - (а) введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют до одного введения антагониста или
 - (б) введение антагониста осуществляют до введения полученного из первичных клеток биологического средства.
3. Способ по п.1 или 2, где введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют до введения антагониста и второе введение полученного из первичных клеток биологического средства осуществляют после введения антагониста или введение антагониста осуществляют до введения полученного из первичных клеток биологического средства и второе введение антагониста осуществляют после введения полученного из первичных клеток биологического средства.
4. Способ по любому из пп.1-3, где полученное из первичных клеток биологическое средство вводят подкожно или перилимфатически, а антагонист PD-L1 или PD-1 вводят внутривенно или перорально.
5. Способ по любому из пп.1-4, где полученное из первичных клеток биологическое средство вводят один раз в день в течение периода до 10 дней, а антагонист PD-L1 или PD-1 вводят один раз в две-четыре недели.
6. Способ по любому из пп.1-5, где антагонист представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, короткую интерферирующую РНК (siRNA), малую молекулу, пептид или антитело.
7. Способ по п.6, где антагонист представляет собой антитело.
8. Способ по п.7, где антитело является человеческим или гуманизированным антителом.
9. Способ по п.7 или 8, где антитело является специфичным к PD-L1.
10. Способ по п.9, где антитело выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559 и авелумаба.
11. Способ по п.6, где антагонист представляет собой CA-170.
12. Способ по п.8, где антитело является специфичным к PD-1.
13. Способ по п.12, где антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680 и REGN2810.
14. Способ по п.6, где антагонист представляет собой AMP-224.
15. Способ по любому из пп.1-14, где субъект является невосприимчивым к лечению с помощью антагониста до введения полученного из первичных клеток биологического средства и/или где уровень PD-L1 в опухоли субъекта повышается после введения полученного из первичных клеток биологического средства.
16. Способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает:
 - а) введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ ; и
 - б) введение субъекту эффективного количества антагониста лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) или белка программируемой смерти клеток 1 (PD-1), где антагонист выбран из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, MEDI-0680, REGN2810, AMP-224, атезолизумаба, дурвалумаба, BMS-936559, авелумаба и CA-170, где полученное из первичных клеток биологическое средство предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51.
17. Способ по любому из пп.1-16, где:

а) эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает по меньшей мере 1 МЕ каждого из IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- α и/или

б) эффективное количество полученного из первичных клеток биологического средства, вводимого субъекту, включает 22-657 международных единиц (МЕ) или 220-6700 пг IL-1 β , 29-478 МЕ или 1730-28100 пг IL-2, 10-185 МЕ или 560-10900 пг IFN- γ , 29-600 МЕ или 580-12000 пг TNF- α , 34-2895 МЕ или 260-22100 пг IL-6 и 5-244 МЕ или 4610-243600 пг IL-8.

18. Способ по любому из пп.1-17, где полученное из первичных клеток биологическое средство дополнительно содержит GM-CSF и G-CSF.

19. Способ по любому из пп.1-18, дополнительно включающий введение субъекту средства, выбранного из группы, состоящей из алкилирующих средств, антиметаболитов, антибиотиков и иммуномодулирующих средств.

20. Способ по любому из пп.1-19, дополнительно включающий введение субъекту NSAID, выбранного из группы, состоящей из индометацина, ибупрофена, цефекоксиба, рофекоксиба и их комбинаций.

21. Способ по любому из пп.1-20, дополнительно включающий введение субъекту цинка перорально.

22. Способ по любому из пп.1-21, дополнительно включающий введение эффективного количества антагониста ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4).

23. Способ по п.22, где антагонист CTLA-4 представляет собой антитело.

24. Способ по п.23, где антитело является человеческим или гуманизированным антителом.

25. Способ по п.23 или 24, где антитело выбрано из группы, состоящей из ипилиумаба и тремелимуаба.

26. Способ отбора субъекта для лечения рака, при этом способ включает:

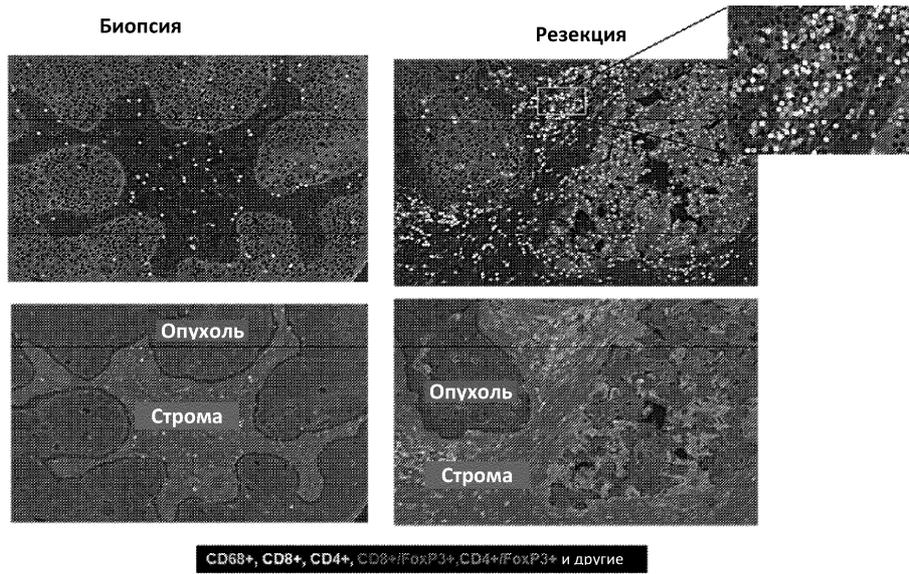
а) определение уровня PD-L1 в образце опухоли, полученном от субъекта, имеющего рак, и которому вводили полученное из первичных клеток биологическое средство, содержащее IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ , где полученное из первичных клеток биологическое средство предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51.

27. Способ оценки вероятности того, что субъект будет восприимчив к антагонисту PD-L1 или PD-1, при этом способ включает:

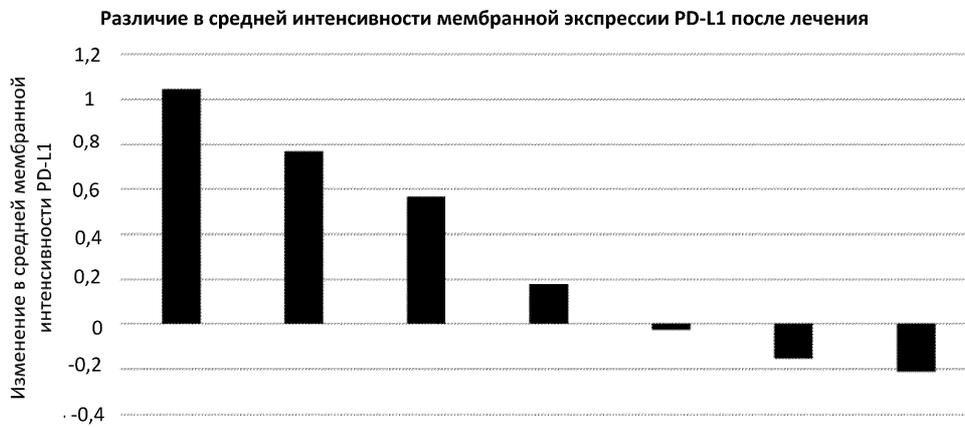
а) введение полученного из первичных клеток биологического средства, содержащего IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α и IFN- γ , субъекту, имеющему рак, который был определен как экспрессирующий первый уровень PD-L1, который является ниже порогового уровня PD-L1, где полученное из первичных клеток биологическое средство предусматривает соотношение международных единиц (МЕ) IL-1 β к МЕ IL-2, составляющее от 0,45 до 1,37, соотношение МЕ IFN- γ к МЕ IL-2, составляющее от 0,19 до 0,39, соотношение МЕ TNF- α к МЕ IL-2, составляющее от 0,53 до 1,26, соотношение МЕ IL-6 к МЕ IL-2, составляющее от 1,16 до 6,06, и соотношение МЕ IL-8 к МЕ IL-2, составляющее от 0,15 до 0,51; и

б) определение второго уровня PD-L1 в образце опухоли, полученном от субъекта, после введения полученного из первичных клеток биологического средства, где последующий за указанным определением второй уровень PD-L1, который выше порогового уровня PD-L1, является показателем того, что субъект будет восприимчив к антагонисту PD-L1 или PD-1.

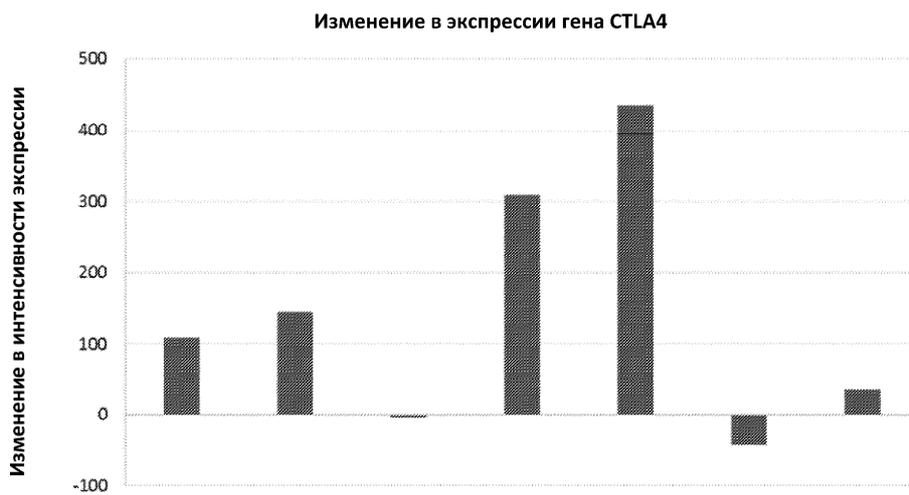
28. Способ по любому из пп.1-27, где антагонист PD-L1 или PD-1 выбран из группы, состоящей из MEDI-0680, REGN2810, атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба и CA-170.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3