

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293302** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.01.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.11

(54) **ДОЗИРОВКА И ВВЕДЕНИЕ АКТИВИРУЕМОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ СТЛА-4**

(31) **63/023,850**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.05.12**

**Джеймс Леонард П., Браун Мишель
(US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/031670**

(74) Представитель:

(87) **WO 2021/231346 2021.11.18**

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Джермакян Р.В., Строкова О.В. (RU)**

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(57) В настоящем изобретении предложены способы дозирования и введения активируемого антитела против СТЛА-4, такого как активируемый ипилимумаб.

202293302

A1

A1

202293302

ДОЗИРОВКА И ВВЕДЕНИЕ АКТИВИРУЕМОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ СТЛА-4

ОПИСАНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке, в соответствии с 35 USC §119(e), испрашивается приоритет по предварительной заявке US № 63/023,850, поданной 12 мая 2020 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Перечень последовательностей, поданный в электронном виде, также полностью включен в настоящий документ посредством ссылки (имя файла: 20210421_SEQ1_13580WOPCT_GB.txt; дата создания: 21 апреля 2021 г.; размер файла: 38 кБ).

Область техники

Настоящая заявка раскрывает способы дозирования и введения активируемых анти-CTLA-4 антител для лечения рака.

Уровень техники

Иммунная система способна контролировать развитие опухоли и опосредовать регрессию опухоли. Для этого требуется генерация и активация Т-клеток, специфичных к антигену опухоли. Множество Т-клеточных костимулирующих рецепторов и Т-клеточных негативных регуляторов или ко-ингибирующих рецепторов действуют совместно, контролируя Т-клеточную активацию, пролиферацию и усиление или потерю эффекторной функции. CD28 и CTLA-4 относятся к ранее и лучше всего охарактеризованным Т-клеточным костимулирующим и коингибирующим молекулам (*Rudd et al. (2009) Immunol. Rev. 229: 12*). CD28 обеспечивает костимулирующие сигналы для взаимодействия с Т-клеточным рецептором посредством связывания с лигандами В7-1 и В7-2 на антигенпрезентирующих клетках, тогда как CTLA-4 отвечает за отрицательный сигнал, подавляющий пролиферацию и функцию Т-клеток. CTLA-4, который также связывает лиганды В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86), но с более высокой аффинностью, чем CD28, действует как негативный регулятор функции Т-клеток как через клеточные автономные (или внутренние), так и клеточные неавтономные (или внешние) пути. Внутренний контроль Т-эффекторной (Teff) функции CD8 и CD4 опосредуется индуцируемой поверхностной экспрессией CTLA-4 в результате активации Т-клеток и ингибированием пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов за счет мультивалентного взаимодействия с лигандами В7 на антагонистических клетках. *Peggs et.al. (2008) Immunol. Rev. 224:141*.

Антитела против CTLA-4 при перекрестном связывании подавляют функцию Т-клеток *in vitro*. *Krummel & Allison (1995) J. Exp. Med. 182:459; Walunas et al. (1994) Immunity 1:405*. Регуляторные Т-клетки (Treg), которые конститутивно экспрессируют CTLA-4, контролируют функцию эффекторных Т-клеток (Teff) не клеточно-автономным образом. Treg клетки, дефицитные по CTLA-4, обладают нарушенной супрессорной способностью (*Wing et al. (2008) Science 322:271*), и антитела, которые блокируют взаимодействие CTLA-4 с B7, могут ингибировать функцию Treg (*Read et al. (2000) J. Exp. Med., 192:295; Quezada et al, p. (2006) J.Clin.Invest., 116:1935*). Совсем недавно также было показано, что Treg контролируют функцию Т-клеток посредством внешних путей (*Corse & Allison (2012) J. Immunol. 189:1123; Wang et al. (2012) J. Immunol. 189:1118*). Внешний контроль функции Т-клеток посредством Treg и Teff возникает благодаря способности CTLA-4-положительных клеток удалять лиганды B7 на антигенпрезентирующих клетках, тем самым ограничивая их костимулирующий потенциал (*Qureshi et al. (2011) Science 332: 600; Onishi et al. (2008) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 105:10113*). Считается, что антительная блокада CTLA-4/B7 взаимодействий способствует активации Teff, препятствуя негативным сигналам, передаваемым при контакте с CTLA-4; этот внутренний контроль активации и пролиферации Т-клеток может способствовать пролиферации как Teff, так и Treg (*Krummel & Allison (1995) J. Exp. Med., 182:459; Quezada et al. (2006) J. Clin. Invest. 116:1935*). В ранних исследованиях на животных моделях было показано, что блокада антителами CTLA-4 усиливает аутоиммунитет (*Perrin et al. (1996) J. Immunol. 157:1333; Hurwitz et al. (1997) J. Neuroimmunol. 73:57*). В дополнение к противоопухолевому иммунитету способность анти-CTLA-4 антител вызывать регрессию сформировавшихся опухолей представляет собой яркий пример терапевтического потенциала блокады CTLA-4 (*Leach et al. (1996) Science 271: 1734*).

Человеческие антитела к человеческому CTLA-4, ипилимумаб и тремелиумаб, были выбраны для ингибирования CTLA-4/B7 взаимодействий (*Keler et al. (2003) J. Immunol. 171:6251; Ribas et al. (2007) Oncologist 12:873*) и протестированы в различных клинических исследованиях при множественных злокачественных новообразованиях (*Hoos et al. (2010) Semin. Oncol. 37:533; Ascierto et al. (2011) J. Transl. Med. 9: 196*). Ипилимумаб, который был впервые одобрен для лечения метастатической меланомы, с тех пор был одобрен для использования и при других видах рака и проходит клинические испытания для новых видов рака (*Hoos et al. (2010) Semin. Oncol. 37:533; Hodi et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363:711; Pardoll (2012) Nat. Immunol. 13(12): 1129*). В 2011 г. ипилимумаб, имеющий константную область IgG1, был одобрен в США и ЕС для лечения неоперабельной или метастатической меланомы на основании улучшения общей

выживаемости в исследовании III фазы ранее леченных пациентов с прогрессирующей меланомой (*Hodi et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363:711*). Часто наблюдалась регрессия опухоли и стабилизация заболевания, но лечение этими антителами сопровождалось побочными эффектами с воспалительными инфильтратами, способными поражать различные системы органов. Тяжесть и частота побочных эффектов при лечении ипилимумабом, к которому прилагается предупреждение в «черной рамке» об иммуноопосредованных побочных реакциях, и в еще большей степени в комбинации с ниволумабом (OPDIVO®), приводят к ограниченному использованию ипилимумаба многими лечащими врачами.

Были разработаны активируемые формы ипилимумаба, в которых легкая цепь содержит маскирующий фрагмент, препятствующий связыванию с CTLA-4, но высвобождающийся преимущественно в микроокружении опухоли после расщепления протеазами, более распространенными и/или активными в опухолях, чем в периферических тканях (*WO 18/085555*). Такая опухолеспецифическая активация обеспечивает полную блокирующую активность CTLA-4 в микроокружении опухоли, способствуя противоопухолевому иммунному ответу, и минимизирует блокаду CTLA-4 в нормальных тканях, где в противном случае она могла бы вызвать системную токсичность. Таким образом, активируемая форма имеет повышенный терапевтический индекс по сравнению с нативной исходной молекулой.

Хотя новый механизм действия активируемых анти-CTLA-4 антител обеспечивает терапевтические преимущества, он создает сложности в отношении способов дозирования и введения из-за новых фармакокинетических и фармакодинамических соображений, отсутствующих при лечении ипилимумабом. Поэтому известные способы дозирования и введения ипилимумаба могут быть неприменимы при лечении активируемыми анти-CTLA-4 антителами. Существует потребность в способах дозирования и введения активируемых анти-CTLA-4 антител, таких как активируемый ипилимумаб, которые максимизируют его терапевтический индекс и оптимизируют воздействие активированного ипилимумаба.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предлагает способы дозирования и введения активируемого анти-CTLA-4 антитела, в которых антитело вводят в виде монотерапии один раз каждые четыре недели (Q4W) или один раз каждые восемь недель (Q8W). Изобретение также относится к способам дозирования и введения активируемого анти-CTLA-4 антитела в комбинации с анти-PD1 или анти-PD-L1 антителом, таким как ниволумаб, в которых

активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят один раз каждые четыре недели (Q4W) или один раз каждые восемь недель (Q8W).

В некоторых вариантах осуществления изобретения активируемое анти-CTLA-4 антитело представляет собой активируемую форму ипилимумаба, такую как антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 и 23 («активируемый ипилимумаб»).

В различных вариантах осуществления изобретения активируемое анти-CTLA-4 антитело, такое как активируемый ипилимумаб, вводят в виде монотерапии в фиксированной дозе 240, 800, 1600 или 2400 мг. В одном из вариантов осуществления изобретения активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в дозе 1600 мг, и оно необязательно может вводиться в режиме Q8W.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в комбинации с анти-PD1 или анти-PD-L1 антителом, таким как ниволумаб, в фиксированной дозе 240, 600, 800, 1200 или 1600 мг. В различных вариантах осуществления изобретения, относящегося к комбинированному введению, анти-PD1 или анти-PD-L1 антитело, такое как ниволумаб, вводят в фиксированной дозе 160, 360 или 480 мг.

В одном варианте комбинированной терапии активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в фиксированной дозе 240 мг, а анти-PD1 или анти-PD-L1 антитело вводят в фиксированной дозе 360 мг, оба в режиме Q3W (каждые три недели). В другом варианте осуществления изобретения предыдущую комбинированную терапию проводят в течение четырех курсов лечения с последующим постоянным поддерживающим лечением, заключающимся в введении 360 мг ниволумаба в режиме Q4W.

В одном из вариантов комбинированной терапии активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в фиксированной дозе 800 мг в режиме Q8W, а анти-PD1 или анти-PD-L1 антитело вводят в фиксированной дозе 480 мг в режиме Q4W. В другом варианте комбинированной терапии активируемое антитело к CTLA-4 вводят в фиксированной дозе 1200 мг в режиме Q8W, а антитело к PD-1 или PD-L1 вводят в фиксированной дозе 480 мг в режиме Q4W. В конкретном варианте осуществления изобретения активируемый ипилимумаб вводят в фиксированной дозе 1200 мг в режиме Q8W, а ниволумаб вводят в фиксированной дозе 480 мг в режиме Q4W.

В другом варианте комбинированной терапии активируемое антитело к CTLA-4 вводят в фиксированной дозе 600 мг в режиме Q4W, а анти-PD1 или анти-PD-L1 антитело

вводят в фиксированной дозе 480 мг в режиме Q4W. В выбранных вариантах комбинированной терапии активируемое антитело к CTLA-4 представляет собой активируемый ипилимумаб, а анти-PD1 или анти-PD-L1 антитело представляет собой ниволумаб. В конкретном варианте осуществления изобретения активируемый ипилимумаб вводят в фиксированной дозе 600 мг в режиме Q4W, а ниволумаб вводят в фиксированной дозе 480 мг в режиме Q4W.

В некоторых вариантах осуществления изобретения стандартные дозы терапевтических антител по настоящему изобретению упакованы в формате, выбранном из группы, состоящей из флаконов, ампул, предварительно заполненных шприцев и автоинъекторов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активируемый ипилимумаб, описанный в настоящем документе, относится к активируемой форме ипилимумаба, содержащей тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую последовательность переменной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 и 23. Переменный домен легкой цепи активируемого ипилимумаба может необязательно дополнительно содержать спейсер с SEQ ID NO: 16, а легкая цепь может содержать константный домен каппа с SEQ ID NO: 14; например, легкая цепь YV39-2011 со спейсером представлена последовательностью SEQ ID NO: 24. Тяжелая цепь активируемого ипилимумаба может дополнительно содержать константный домен IgG1 с SEQ ID NO: 10, как, например, тяжелая цепь ипилимумаба, представленная последовательностью SEQ ID NO: 11 или 12. Активируемый ипилимумаб может содержать тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 11 или 12, и легкую цепь, содержащую легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 24.

В различных вариантах осуществления изобретения анти-PD1 или анти-PD-L1 представляет собой ниволумаб, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 или 26 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 27.

Способы дозирования и введения по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения различных заболеваний, таких как рак, включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC), колоректальный рак (CRC), почечно-клеточную карциному (RCC), кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC), рак мочевого пузыря, рак желудка, рак пищевода и меланому. В конкретных вариантах осуществления изобретения способы дозирования и введения по настоящему изобретению используются для лечения по показаниям, для которых одобрен ипилимумаб, таких как неоперабельная или метастатическая меланома, или адъювантное лечение меланомы, или при введении в

комбинации с анти-PD1 или анти-PD-L1 антителом, таким как ниволумаб, для лечения распространенной почечно-клеточной карциномы (RCC), метастатического колоректального рака с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) или с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR), меланомы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), злокачественной мезотелиомы плевры или гепатоклеточной карциномы. В одном из вариантов осуществления изобретения способы дозирования и введения по настоящему изобретению применяют для лечения ранее нелеченной неоперабельной меланомы III-IV стадии.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

Для облегчения понимания представленного раскрытия сначала даются определения некоторых терминов. При использовании в настоящем документе, если специально не указано иное, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное ниже. Дополнительные определения приведены по тексту всей заявки.

В контексте настоящего документа «активируемые анти-CTLA-4 антитела» относятся к модифицированным формам антагонистических антител к CTLA-4, которые блокируют связывание CTLA-4 с лигандами B7, содержащим структурные модификации, которые ингибируют связывание с CTLA-4 до расщепления протеазами, наиболее распространенными и/или активными в микроокружении опухоли. К «активируемым анти-CTLA-4 антителам» относятся активируемые формы ипилимумаба, такие как антитела, содержащие легкие цепи, модифицированные таким образом, чтобы они содержали маскирующий фрагмент (MM) и расщепляемый фрагмент (CM), как описано в WO 18/085555, например, активируемый ипилимумаб.

В контексте настоящего документа «активируемый ипилимумаб» относится к активируемой форме ипилимумаба, содержащей тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, содержащую последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 и 23. Вариабельный домен легкой цепи активируемого ипилимумаба может необязательно дополнительно содержать спейсер с SEQ ID NO: 16, а легкая цепь может содержать константный домен каппа с SEQ ID NO: 14, например, легкая цепь YV39-2011 со спейсером представлена последовательностью SEQ ID NO: 24. Тяжелая цепь активируемого ипилимумаба может дополнительно содержать константный домен IgG1 с SEQ ID NO: 10, как, например, тяжелая цепь ипилимумаба, представленная последовательностью SEQ ID NO : 11 или 12. Активируемый ипилимумаб

может содержать тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 11 или 12, и легкую цепь, содержащую легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 24.

«Адьювант» в контексте настоящего документа относится к агенту, который вводят субъекту вместе с вакциной для усиления иммунного ответа на вакцину по сравнению с иммунным ответом, который возник бы в результате введения вакцины без адьюванта. Адьювант может также относиться к использованию агента после хирургического удаления опухоли для снижения риска рецидива заболевания, как в случае применения ипилимумаба или активируемого ипилимумаба после хирургического удаления меланомы.

«Введение» или «применение» относится к физическому введению субъекту композиции, содержащей терапевтическое средство, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Предпочтительные пути введения антител по изобретению включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, инъекции или инфузии. В контексте настоящего документа фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции и включает, без ограничения, внутривенные, внутрибрюшинные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрилимфатические, внутриочаговые, интракапсулярные, интраорбитальные, интракардиальные, внутрикожные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и внутригрудинные инъекции и инфузии, а также электропорацию *in vivo*. Антитело по изобретению также можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный пути введения или через слизистые, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, однократно, многократно и/или в течение одного или более длительных периодов времени.

Если не указано иное, введение антител для лечения рака является парентеральным, таким, как внутривенное (iv) или подкожное (sc). Способы дозирования и введения по настоящему изобретению могут осуществляться на протяжении любого числа циклов лечения, от одного, двух, трех, четырех циклов и т.д., до непрерывного лечения (повторение дозирования до тех пор, пока не отпадет необходимость, произойдет рецидив заболевания или возникнет неприемлемая токсичность). Для целей комбинированной терапии, в соответствии с настоящим изобретением, один цикл включает минимальную единицу введения, которая включает по меньшей мере одну дозу каждого компонента (лекарственного средства).

«Начальная доза» или «введение начальной дозы» в контексте настоящего документа относится к первому введению дозы пациенту по схеме и любым последующим повторениям той же схемы применения препарата (таким как второй, третий и четвертый циклы и т. д.) и отличается от «поддерживающей дозы» или «введения поддерживающей дозы», которые относятся к последующим дозам, вводимым в течение более длительного периода после начальной дозы или доз, например, от более трех месяцев до нескольких лет или даже в течение неопределенного времени. Поддерживающая доза может необязательно включать менее частое введение и/или более низкую дозу, чем начальная доза. Если не указано иное, схемы применения препарата, раскрытые и заявленные в настоящем документе, представляют собой начальные дозы и введение начальной дозы.

«Комбинированная терапия» в контексте настоящего документа относится к введению двух или более терапевтических средств в согласованном плане лечения, в котором для обеспечения общего терапевтического эффекта доза и частота введения первого компонента комбинации связаны с дозой и частотой введения второго компонента. Она не ограничивается какими-либо конкретными особенностями введения и включает введение в виде смеси компонентов, введение в виде отдельных композиций, одновременное или последовательное в определенный день. Хотя комбинированная терапия наиболее удобна, когда схемы введения препарата одинаковы или кратны друг другу (например, режимы Q4W и Q8W), она также включает введение в разные дни, если частоты введения для любого данного цикла не совпадают.

«Антитело» (Ab) включает, без ограничения, гликопротеиновый иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном и содержит по меньшей мере две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), соединенные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL дополнительно подразделяются на гиперпеременные участки, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

В контексте настоящего документа и в соответствии с общепринятой интерпретацией, антитело, которое описано как содержащее «тяжелую цепь и/или легкую цепь», относится к антителам, которые содержат «по меньшей мере одну» из указанных тяжелых и/или легких цепей, и, таким образом, будут охватывать антитела, имеющие две или более тяжелых и/или легких цепей. В частности, антитела, описанные таким образом, будут охватывать обычные антитела, имеющие две практически идентичные тяжелые цепи и две практически идентичные легкие цепи. Цепи антител могут быть практически идентичными, но не полностью идентичными, если они различаются из-за посттрансляционных модификаций, таких как отщепление остатков лизина на С-конце, альтернативные схемы гликозилирования и т.п. Однако антитела, отличающиеся фукозилированием гликанов, по существу не являются идентичными.

В контексте настоящего документа «вариабельный домен легкой цепи» легкой цепи антитела включает каркасные области легкой цепи (FR) и последовательности CDR, такие как FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4, как, например, вариабельный домен легкой цепи ипилимумаба, представленный в SEQ ID NO: 13. Когда термин используется в отношении активируемых антител против CTLA-4, «вариабельный домен легкой цепи» может дополнительно содержать маскирующий фрагмент, расщепляемый фрагмент и, необязательно, другие раскрытые здесь элементы последовательности.

Если не указано иное или не ясно из контекста, антитело, определяемое его специфичностью к мишени (например, «анти-CTLA-4 антитело»), относится к антителам, которые могут связываться с человеческой мишенью (т.е. человеческим CTLA-4). Такие антитела могут связываться или не связываться с CTLA-4 других видов.

Иммуноглобулин может происходить из любого общеизвестного изоформа, включая, но не ограничиваясь следующими: IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изоформ IgG в случае определенных видов может быть разделен на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. «Изоформ» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи. «Антитело» включает, например, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела, включая аллотипические варианты; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие или нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела. Если не указано иное или не ясно из контекста, раскрытые здесь антитела представляют собой человеческие IgG1 антитела. Последовательности константных доменов IgG1 включают, но не ограничиваются известными IgG1 аллотипическими вариантами. Последовательности в

Перечне последовательностей, конечно же, включают предложенные здесь последовательности, а не какие-либо другие последовательности.

«Выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CTLA-4). Однако, выделенное антитело, которое специфически связывается с CTLA-4, может перекрестно реагировать с другими антигенами, такими как молекулы CTLA-4 из других видов. Более того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ. Для сравнения, «выделенная» нуклеиновая кислота относится к смеси нуклеиновых кислот, которые заметно отличаются, т.е. имеют отличающееся химическое название, природу и применение, от нуклеиновых кислот, встречающихся в природе. Например, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, представляет собой самостоятельную часть нативной ДНК, а не составную часть более крупного структурного комплекса — хромосомы, встречающейся в природе. Кроме того, выделенная ДНК, в отличие от нативной ДНК, может использоваться в качестве ПЦР-праймера или гибридизационного зонда, помимо прочего, для измерения экспрессии генов и обнаружения биомаркеров генов или мутаций с целью диагностики заболевания или прогнозирования эффективности терапевтического средства. Выделенная нуклеиновая кислота также может быть подвергнута очистке с использованием стандартных методик, хорошо известных в данной области, чтобы она была по существу свободной от других клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков.

Термин «моноклональное антитело» («mAb») относится к препарату молекул антител одного молекулярного состава, т.е. молекул антител, первичные последовательности которых по существу идентичны и которые проявляют одинаковую специфичность связывания и аффинность по отношению к конкретному эпитопу. Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридом, рекомбинантных, трансгенных или других способов, известных специалистам в данной области техники.

«Человеческое» антитело (HuMAb) относится к антителу, содержащему переменные области, в которых как каркасная, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие

антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или посредством соматических мутаций *in vivo*). Однако в контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» не подразумевает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были привиты к человеческим каркасным последовательностям. Термины «человеческие» антитела и «полностью человеческие» антитела используются как синонимы.

«Фрагмент антитела» относится к части целого антитела, обычно включающей «антигенсвязывающую часть» («антигенсвязывающий фрагмент») интактного антитела, которая сохраняет способность специфически связываться с антигеном, с которым связывается интактное антитело, а также сохраняет способность связывания с FcR, опосредованную Fc-областью антитела.

«Антителозависимая клеточная цитотоксичность» («ADCC») относится к клеточно-опосредованной реакции *in vitro* или *in vivo*, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие FcR (например, природные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы) узнают антитело, связанное с поверхностным антигеном на клетке-мишени, и затем вызывают лизис клетки-мишени. В принципе, любая эффекторная клетка с активированным FcR может быть переключена в режим, содействующий ADCC.

«Рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани, а также могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки.

«Рецептор клеточной поверхности» относится к молекулам и комплексам молекул, способным принимать сигнал и передавать такой сигнал через плазматическую мембрану клетки.

«Эффекторная функция» относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому событию, которое происходит в результате этого. Типичные «эффекторные функции» включают связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), и даун-регуляцию рецептора клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют,

чтобы Fc-область была соединена со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела).

«Иммунный ответ» — это биологический ответ внутри позвоночного против чужеродных агентов, который защищает организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредуется действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, природной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночных вторгшихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

«Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» относится к компоненту сигнального пути, который может быть вовлечен в модулирование, регулирование или изменение иммунного ответа. «Модулирование», «регулирование» или «изменение» иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или к изменению активности такой клетки. Такая модуляция включает стимуляцию или подавление иммунной системы, что может проявляться как увеличение или уменьшение числа различных типов клеток, повышение или снижение активности этих клеток или любыми другими изменениями, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут иметь усиленную функцию в микроокружении опухоли. В предпочтительных вариантах раскрытого изобретения иммуномодулятор находится на поверхности Т-клетки. «Иммуномодуляторная мишень» или «иммунорегуляторная мишень» представляет собой иммуномодулятор, который является мишенью для связывания с веществом, агентом, фрагментом, соединением или молекулой, и активность которого изменяется в результате такого связывания. Иммуномодуляторные мишени включают, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодуляторные рецепторы») и лиганды рецепторов («иммуномодуляторные лиганды»).

«Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, пораженного или подверженного риску заражения или страдающего рецидивом заболевания, способом, включающим индукцию, усиление, подавление или иное изменение иммунного ответа.

«Потенцирование эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или силы существующего иммунного ответа у субъекта. Это увеличение

эффективности и силы может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина, или путем стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

«Белок» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно соединенных аминокислотных остатка, без верхнего предела в отношении длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификации, связанные с гликозилированием, фосфорилированием или образованием дисульфидной связи, но не ограничиваясь ими. Термин «белок» используется здесь взаимозаменяемо с термином «полипептид».

«Субъект» включает любого человека или отличное от человека животное. Термин «отличное от человека животное» включает, но не ограничивается такими позвоночными, как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кролики, грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки, видами птиц, такими как куры, амфибиями и рептилиями. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее, такое как отличный от человека примат, овца, собака, кошка, кролик, хорек или грызун. В более предпочтительных вариантах осуществления любого аспекта раскрытого изобретения субъектом является человек. Если не указано иное, субъект, упомянутый в данном документе, представляет собой человека. Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящем документе, как взаимозаменяемые.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства, такого как Fc слитый белок по изобретению, представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, подтверждаемой снижением тяжести симптомов заболевания, увеличением частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращением ухудшения состояния или инвалидности вследствие заболевания. Терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства включает «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективную дозу», которые представляют собой любое количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту с риском развития заболевания или страдающего рецидивом заболевания, тормозит развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического средства способствовать регрессу заболевания или ингибированию развития или рецидива заболевания может быть оценена с помощью различных методов, известных специалистам в данной области, например, на людях во время клинических испытаний, на животных моделях, предсказывающих

эффективность у человека, или посредством анализа активности данного средства в *in vitro* исследованиях.

Например, противораковое средство способствует регрессии рака у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии рака вплоть до исчезновения рака. «Стимулирование регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома болезни, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов болезни, предотвращению ухудшения состояния или инвалидности вследствие болезни или другому уменьшению интенсивности симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на уровне клеток, органов и/или организма (побочные эффекты), возникающим в результате введения лекарственного средства.

Например, в случае лечения опухолей, терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере примерно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере примерно на 60%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 80% по отношению к нелеченым субъектам. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, т.е. предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценивать на животной модели, такой как аденокарцинома толстой кишки СТ26, аденокарцинома толстой кишки МС38 и мышинных опухолевых моделях фибросаркомы SalN, которые позволяют прогнозировать эффективность в отношении опухолей человека. В качестве альтернативы, это свойство композиции может быть оценено путем оценки способности соединения ингибировать рост клеток, такое ингибирование может быть измерено *in vitro* с помощью анализов, известных практикующим специалистам. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения регрессия опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение периода, составляющего по меньшей мере

примерно 20 дней, более предпочтительно - по меньшей мере примерно 40 дней, или еще более предпочтительно - по меньшей мере примерно 60 дней.

«Лечение» или «терапия» субъекта означает любой тип вмешательства или процесса, осуществляемого в отношении субъекта, или введение субъекту активного агента с целью обратить вспять, облегчить, снизить выраженность, ингибировать, замедлить или предотвратить начало, прогрессирование, развитие, тяжесть или рецидив симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

Дозирование и введение активируемых анти-CTLA-4 антител

Единственное одобренное антитело к CTLA-4, ипилимумаб (YERVOY®), обеспечивает долгосрочную выживаемость до 25% пациентов с метастатической меланомой при введении в дозе 3 мг/кг (метастатическая меланома) или 10 мг/кг (адьювантная меланома), но лечение часто сопровождается токсичностью. Активируемые антитела, которые предпочтительно активируются протеазами, ассоциированными с опухолью, обещают снижение периферической токсичности при данной дозе, что позволяет использовать более высокие (и, следовательно, потенциально более эффективные) дозы для любого заданного уровня токсичности или некоторого промежуточного значения из двух. Активируемый ипилимумаб был предложен в качестве улучшенного и более безопасного способа воздействовать на путь CTLA-4, чем ипилимумаб, который, как известно, вызывает ограниченные побочные эффекты при более высоких дозах. WO 18/085555. Предложенные здесь способы дозирования и введения необходимы для получения наибольшего преимущества от концепции активируемых антител и максимизации терапевтического индекса. Новый механизм действия при лечении опухоли-активируемыми антителами против CTLA-4 означает, что предшествующие сведения о дозировании и опыт, на который можно было бы положиться, отсутствуют.

Настоящее изобретение частично основано на результатах ранних клинических исследований активируемого ипилимумаба на людях. Анализ биоптатов опухолей показал, что, как и предполагалось, в ТМЕ (в микроокружении опухоли) по сравнению с плазмой активируемый ипилимумаб преимущественно превращается в моно- и би-расщепленные формы. Это предпочтительное расщепление приводит к повышению безопасности, поскольку периферическая активность анти-CTLA-4 (расщепляемых форм) ниже для любого заданного уровня активности анти-CTLA-4 в опухоли.

Кроме того, исследования экспрессии генов в биоптатах субъектов, получавших активируемый ипилимумаб, показали ту же картину результатов, что и ранее с ипилимумабом, что позволяет предположить, что действие активируемого ипилимумаба опосредовано той же анти-CTLA-4 активностью, что и в случае ипилимумаба, что согласуется с ожидаемым механизмом действия. Субъекты, демонстрирующие улучшение клинических показателей (уменьшение целевого поражения) в результате лечения активируемым ипилимумабом, демонстрируют повышенную экспрессию панели воспалительных генов на 15-й день первого цикла лечения по сравнению с экспрессией до лечения. В противоположность этому, ни у субъектов со стабильным заболеванием (рост <20%, но без уменьшения целевого поражения), ни у пациентов, не демонстрирующих улучшения клинических показателей (>20% роста целевого поражения), не наблюдалось такой повышенной экспрессии воспалительных генов. Та же картина наблюдалась и в клинических исследованиях ипилимумаба. Кроме того, исследования дозирования активируемого ипилимумаба неожиданно показали, что схема введения активируемого ипилимумаба в режиме Q8W превосходит режим Q4W. Фармакокинетические исследования первого цикла показали, что субъекты, получавшие 1600 мг в режиме Q8W (каждые 8 недель), демонстрировали воздействие Стах на моно- и двойное расщепление, эквивалентное тому, что получалось в случае субъектов, получавших 1600 мг в режиме Q4W (каждые 4 недели). Субъекты, получавшие 1600 мг в режиме Q8W, также показали примерно вдвое большее воздействие на моно- и двойное расщепление по сравнению с теми, кто получал 800 мг в режиме Q4W. Также было обнаружено, что режим Q8W безопаснее, чем дозировка такого же количества лекарственного средства в режиме Q4W. У субъектов, которым вводили 1600 мг в режиме Q8W, частота побочных эффектов была ниже, чем у субъектов, получавших 800 мг в режиме Q4W. Эти результаты, взятые вместе, позволяют предположить, что введение активируемого ипилимумаба в режиме Q8W предпочтительнее режима Q4W, так как оно обеспечивает усиленное воздействие для данного количества вводимого лекарственного средства со значительно меньшими побочными эффектами. Этот улучшенный профиль может быть частично обусловлен кинетикой воздействия активированного соединения, поскольку активное лекарство непрерывно образуется из исходного соединения и, таким образом, имеет более длительный кажущийся период полужизни.

Тем не менее, введение активируемого ипилимумаба в режиме Q4W вместе с антителами против PD-1 или против PD-L1, такими как ниволумаб, остается жизнеспособной альтернативной схемой введения для комбинированной терапии. Указанный режим введения Q4W позволяет совместить этот режим комбинированной

терапии со схемами введения Q2W или Q4W, используемыми при монотерапии ниволумабом (OPDIVO®) и, таким образом, является более удобным и менее дорогим, чем существующие одобренные режимы комбинированной терапии Q3W для YERVOY® и OPDIVO® (Инструкция по применению препарата OPDIVO®, обновлена в марте 2020 г.).

Терапевтические антитела для лечения рака обычно вводят с интервалами, приблизительно равными периоду полувыведения антитела у человека, который составляет примерно 21 день для IgG. Одобренные в настоящее время моноклональные антитела для лечения рака обычно вводят каждые одну (QW), две (Q2W), три (Q3W) или четыре недели (Q4W), причем наиболее распространенными являются схемы Q2W и Q3W. *Hendrikx et al. (2017) Oncologist 22:1212, Ovacik and Lin (2018) Clin. Transl. Sci. 11:540*. Например, различные одобренные терапевтические антитела для лечения рака вводят в режимах Q2W/Q4W (OPDIVO®); Q3W (KEYTRUDA®, YERVOY®); Q2W/Q3W/Q4W (TECENTRIQ®). Период полувыведения YERVOY® (ипилимумаб) составляет 15,4 дня, и он одобрен для введения в режиме Q3W, хотя его также вводят в режиме Q12W для поддерживающего лечения адьювантной меланомы в длительном периоде после первых четырех доз в режиме Q3W. (Инструкция по применению препарата YERVOY®, обновлена в марте 2020 г.). Интервалы введения, приблизительно равные периоду полувыведения антител, рациональны, поскольку они обеспечивают пополнение до того, как уровни лекарственного средства значительно снизятся, тем самым способствуя равномерному уровню циркулирующего лекарственного средства (равномерному воздействию) в стационарном состоянии.

Активируемый ипилимумаб содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи в традиционной бивалентной структуре IgG, хотя и с дополнительными элементами последовательности (включая MM и CM) на N-концах легких цепей. Поскольку каждый CM может быть независимо расщеплен, активируемый ипилимумаб может существовать в интактной/нерасщепленной, монорасщепленной и бирасщепленной формах одновременно. Без намерения ограничиваться теорией, следует отметить, что неожиданные результаты, касающиеся введения в режиме Q8W, могут быть следствием сложной фармакокинетики этих трех различных видов антител, в которых моно- и бирасщепляемые формы получают из интактного активируемого ипилимумаба в течение определенного времени за счет расщепления протеазой; в то же время уровни антител всех форм уменьшаются в соответствии с их уникальными периодами полувыведения. Не желая ограничиваться теорией, отметим, что введение в режиме Q8W может предотвратить накопление моно- и бирасщепленных (активных) антител в периферической области, что в противном случае могло бы произойти (как при введении в режиме Q4W) и вызвать побочные эффекты.

Краткое описание перечня последовательностей

SEQ ID NO:	Описание
1	Человеческий CTLA-4 (NP_005205.2)
2	Человеческий CD28 (NP_006130.1)
3	CDRH1 ипилимумаба
4	CDRH2 ипилимумаба
5	CDRH3 ипилимумаба
6	CDRL1 ипилимумаба
7	CDRL2 ипилимумаба
8	CDRL3 ипилимумаба
9	Вариабельный домен тяжелой цепи ипилимумаба
10	IgG1 константный домен
11	Тяжелая цепь ипилимумаба без С-концевого лизина
12	Тяжелая цепь ипилимумаба
13	Вариабельный домен легкой цепи ипилимумаба
14	Константный домен каппа
15	Легкая цепь ипилимумаба
16	Спейсер QGQSGS
17	Маскирующий фрагмент YV39
18	Расщепляемый фрагмент 2001
19	Расщепляемый фрагмент 2011
20	Расщепляемый фрагмент 2012
21	YV39-2001 VL
22	YV39-2011 VL
23	YV39-2012 VL
24	Спейсер-YV39-2001 VL
25	Тяжелая цепь ниволумаба без С-концевого лизина
26	Тяжелая цепь ниволумаба
27	Легкая цепь ниволумаба

Что касается последовательностей антител, в Перечне последовательностей приведены последовательности зрелых вариабельных областей и тяжелых и легких цепей, т.е. последовательности не содержат сигнальные пептиды.

Эквиваленты:

Специалистам в данной области техники будут известны или они смогут установить с помощью не более чем рутинных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, раскрытых в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются приведенной формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта-человека с помощью активируемого анти-CTLA-4 антитела, включающий введение активируемого анти-CTLA-4 антитела один раз каждые четыре недели (Q4W) или один раз каждые восемь недель (Q8W);

при этом активируемое анти-CTLA-4 антитело содержит:

a. тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 9; и

b. легкую цепь, содержащую последовательность вариабельного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 и 23.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело содержит:

a. тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11; и

b. легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в режиме Q8W.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в фиксированной дозе 240, 800, 1600 или 2400 мг.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в фиксированной дозе 1600 мг в режиме Q8W.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из:

a. неоперабельной или метастатической меланомы; и

b. адьювантного лечения меланомы.

7. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта-человека с помощью активируемого анти-CTLA-4 антитела в комбинации с ниволумабом, включающий введение активируемого анти-CTLA-4 антитела один раз каждые четыре недели (Q4W) или один раз каждые восемь недель (Q8W), при этом активируемое анти-CTLA-4 антитело содержит:

a. тяжелую цепь, содержащую последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 9; и

b. легкую цепь, содержащую последовательность вариабельного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22 и 23.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело содержит:

a. тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11; и

b. легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24.

9. Способ по п.7 или 8, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в режиме Q8W.

10. Способ по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что активируемое анти-CTLA-4 антитело вводят в фиксированной дозе 240, 600, 800, 1200 или 1600 мг.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что ниволумаб вводят в фиксированной дозе 480 мг в режиме Q4W.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что активируемый ипилимумаб вводят в фиксированной дозе 600 мг в режиме Q4W.

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что активируемый ипилимумаб вводят в фиксированной дозе 1200 мг в режиме Q8W.

14. Способ по любому из пп.7-13, отличающийся тем, что рак выбирают из группы, состоящей из:

a. распространенной почечно-клеточной карциномы;

b. метастатического колоректального рака с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) или с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR);

c. меланомы;

d. немелкоклеточного рака легкого (NSCLC);

e. злокачественной мезотелиомы плевры; и

f. гепатоклеточной карциномы.