(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390055 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.10

(22) Дата подачи заявки
2021.06.18

(51) Int. Cl. ***A61K 45/06*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 9/99 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С Т-КЛЕТОЧНЫМ АНТИГЕНОМ МОЛЕКУЛА АНТИТЕЛА, ПРЕДНАЗНАЧЕННАЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРОМ АНГИОГЕНЕЗА

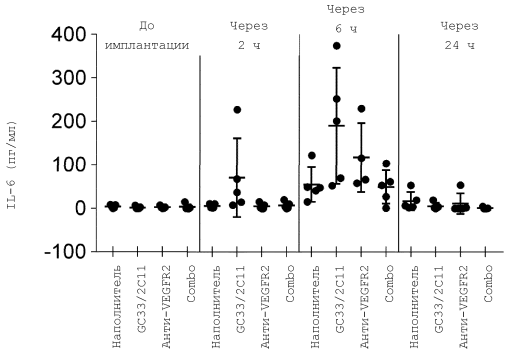
(31) **2020-106501**
(32) **2020.06.19**
(33) **JP**
(86) **PCT/JP2021/023149**
(87) **WO 2021/256555 2021.12.23**

(71) Заявитель:
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

(72) Изобретатель:
Танака Такаёси, Сано Юдзи, Кавай Юмико (JP)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описан способ предупреждения, ослабления или лечения высвобождения цитокинов или побочного действия, индуцированного высвобождением цитокинов, путем введения ингибитора VEGF. Предложена также комбинированная терапия для предупреждения, ослабления или лечения высвобождения цитокинов или побочного действия, индуцированного высвобождением цитокинов, в которой применяют стимулирующее лимфоциты лекарственное средство, типичным представителем которого является связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела, и ингибитор VEGF. Например, среди связывающихся с Т-клеточным антигеном молекул антител антитело, которое обладает способностью приводить к рекрутменту Т-клетки в качестве эффекторной клетки к опухолевой ткани, обозначают как "перенаправляющее Т-клетки антитело", и оно известно в качестве средства лечения опухолей. При этом, когда связывание антитела с Т-клетками стимулирует системное производство цитокинов, то указанная системная функция может приводить к нарушениям, таким как CRS. В изобретении предложены средства снижения системного производства цитокинов, и, как следствие, обеспечения безопасного применения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела при лечении опухолей.



202390055 A1

202390055 A1

СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С Т-КЛЕТОЧНЫМ АНТИГЕНОМ МОЛЕКУЛА АНТИТЕЛА, ПРЕДНАЗНАЧЕННАЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРОМ АНГИОГЕНЕЗА

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем описании предложены связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител, предназначенные для применения в комбинации с ингибиторами ангиогенеза. Кроме того, в настоящем описании предложены фармацевтические композиции и способы предупреждения, ослабления или лечения нежелательных реакций, вызываемых производством цитокинов, ассоциированных с введением связывающихся с антигеном Т-клеток молекул антител.

Предпосылки создания изобретения

Антитела привлекают внимание в качестве фармацевтических средств, поскольку они обладают высокой стабильностью в плазме и обладают небольшим количеством нежелательных реакций (NPL 1 и NPL 2). Известно, что антитела индуцируют не только антигенсвязывающее действие, агонистическое действие и антагонистическое действие, но также и опосредуемые эффекторными клетками цитотоксические действия (называемые также эффекторными функциями), такие как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), и обладают противоопухолевыми действиями в отношении раковых клеток (NPL 3). Создан ряд терапевтических антител с установленными очень высокими противоопухолевыми действиями в качестве фармацевтических средств, предназначенных для лечения рака (NPL 4); и хотя установлено, что известные терапевтические антитела обладают очень высокими действиями, достигаемый при применении указанных антител исход лечения все еще остается неудовлетворительным.

Антитела (биспецифические антитела), одна молекула которых связывается с двумя или большим количеством типов антигенов, изучены в качестве молекул, которые ингибируют несколько мишеней. Если все антигены, распознаваемые биспецифическим антителом, представляют собой антигены, которые специфически экспрессируются при раке, то биспецифическое антитело проявляет цитотоксическую

активность в отношении раковых клеток при связывании с любым из антигенов; таким образом, по сравнению с фармацевтическим средством на основе канонического антитела, которое распознает один антиген, у указанного антитела можно ожидать более эффективное противоопухолевое действие.

В качестве одного из биспецифических антител перенаправляющее Т-клетку антитело, которое представляет собой антитело, механизмами противоопухолевого действия которого является цитотоксичность, опосредуемая рекрутментом Т-клеток в качестве эффекторных клеток, известно с 1980-х годов (NPL 5, 6 и 7). В отличие от антител, которые используют ADCC, опосредуемую рекрутментом NK-клеток или макрофагов в качестве эффекторных клеток, в качестве механизма их противоопухолевого действия, перенаправляющее Т-клетки антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее антитело против любой одной из субъединиц, из которых состоит комплекс Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках, в частности, антитело, связывающееся с эпсилон-цепью CD3, и антитело, связывающееся с антигеном на раковой клетке-мишени. Т-клетки приходят в контакт с раковыми клетками посредством одновременного связывания перенаправляющего Т-клетки антитела с эпсилон-цепью CD3 и раковым антигеном. Это в результате приводит к противоопухолевому действию в отношении раковых клеток благодаря цитотоксической активности, обусловленной Т-клетками. Например, в последние годы разработаны новые перенаправляющие Т-клетки антитела, которые представляют собой антитела, два Fab-фрагмента которых связываются соответственно с раковым антигеном (GPC3) и CD3ε-цепью, экспрессируемой на Т-клетках, и имеют Fc-область с пониженной FcγR-связывающей активностью (PTL 1 и 2).

С другой стороны, описано проявление токсичности, ассоциированной с проявлением высокой противоопухолевой активности перенаправляющего Т-клетки антитела, например, развитие синдрома выброса цитокинов (CRS) (NPL 8).

Перечень процитированных документов

Патентная литература

[PTL 1] WO 2012/073985(патент на концепцию TRAB)

[PTL 2] WO 2016/047722(патент на продукт ERY974)

Непатентная литература

[NPL 1] Nat. Biotechnol. 23, 2005, cc. 1073-1078.

[NPL 2] Eur J Pharm Biopharm. 59 (3), 2005, cc. 389-396.

[NPL 3] Drug Des Devel Ther 3, 2009, cc. 7-16.

[NPL 4] Clin Cancer Res. 16 (1), 2010, сс. 11-20.

[NPL 5] Nature 314 (6012), 1985, сс. 628-631.

[NPL 6] Int J Cancer 41 (4), 1988, сс. 609-615.

[NPL 7] Proc Natl Acad Sci USA 83 (5), 1986, сс. 1453-1457.

[NPL 8] Cancer J. 20(2), март-апрель 2014 г., сс. 119-122.

Краткое изложение сущности изобретения

Задачи, положенные в основу настоящего изобретения

Не ограничивающим объем настоящего изобретения вариантом осуществления изобретения являются комбинированные терапии, включающие связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела и ингибитор ангиогенеза, а также фармацевтические композиции и т.п., предназначенная для применения в комбинированных терапиях.

Средства решения указанных задач

При создании настоящего изобретения, что отражено в не ограничивающем объем изобретения варианте осуществления изобретения, установлено, что введение фактора роста эпителиальных клеток сосудов (сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF)), который является типичным ингибитором ангиогенеза, может предупреждать, ослаблять или лечить синдром выброса цитокинов (CRS), ассоциированный с введением индивидууму связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

Не ограничивающими объем настоящего изобретения вариантами осуществления изобретения являются следующие:

(A1) фармацевтическая композиция, содержащая связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, где ее применение в комбинации с ингибитором сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) предупреждает и/или ослабляет, и/или лечит синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов;

(A1-1) фармацевтическая композиция по п. (A1), где ингибитор VEGF вводят до, одновременно или после введения фармацевтической композиции;

(A1-2) фармацевтическая композиция по п. (A1), где ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(A1-3) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-2), где ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения фармацевтической композиции, или в тот же день, но до введения фармацевтической композиции;

(A1-4) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-3), где ингибитор VEGFпредставляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(A1-5) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-4), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта ;

(A1-6) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-5), которая дополнительно предназначена для применения в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек;

(A1-7) фармацевтическая композиция по п. (A1 -6), где ингибитор цитокинов вводят после введения фармацевтической композиции;

(A1-8) фармацевтическая композиция по п. (A1) или п. (A1-7), где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(A1-9) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-8), где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(A1-10) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-8), где кортикостероид вводят дополнительно до, одновременно или после введения фармацевтической композиции;

(A1-11) фармацевтическая композиция по п. (A1-9) или п. (A1-10), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(A1-12) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-11), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(A1-13) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-12), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(A1-14) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-13), предназначенная для лечения рака;

(A1-15) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-14), предназначенная для лечения рака, при этом, предупреждая или ослабляя синдром выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(A1-16) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-15), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

(A1-17) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (A1)-(A1-16), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

Альтернативно этому, не ограничивающими объем настоящего изобретения вариантами осуществления изобретения являются следующие варианты:

(A2) набор, содержащий (I) контейнер, (II) фармацевтическую композицию в контейнере, где композиция содержит связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, и

(III) документ, включающий инструкцию по введению ингибитора VEGF до, одновременно или после введения фармацевтической композиции, для предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(A2-1) набор, содержащий (I) контейнер, (II) фармацевтическую композицию в контейнере, где композиция содержит связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, и (III) документ, включающий инструкцию по введению ингибитора цитокинов за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения фармацевтической композиции, или в тот же день, но до введения;

(A2-2) по п. (A2) или п. (A2-1), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(A2-3) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-2), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба, и афлиберцепт;

(A2-4) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-3) дополнительно содержащий этикетку, прилагаемую к контейнеру, где на этикетке указано, что фармацевтическую композицию можно применять для лечения рака;

(A2-5) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-4), содержащий документ с инструкций о дополнительном применении фармацевтической композиции в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек;

(A2-6) набор по п. (A2-5), где ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(A2-7) набор по п. (A2-5) или п. (A2-6), где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб; где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(A2-8) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-7), дополнительно содержащий документ с инструкцией о том, что кортикостероид не вводят дополнительно до, одновременно или после введения фармацевтической композиции;

(A2-10) набор по п. (A2-8) или п. (A2-9), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(A2-11) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-10), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(A2-12) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-11),

, в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(A2-13) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-12), где применение фармацевтической композиции осуществляют согласно инструкциям в документе;

(A2-14) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-14), предназначенный для лечения рака согласно предписаниям, указанным в документе;

(A2-15) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-13), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

(A2-16) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-15), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей;

(A2-17) набор по одному из п.п. (A2)-(A2-16), где назначение фармацевтической композиции осуществляют согласно инструкциям в документе;

(A3) применение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела для приготовления фармацевтической композиции,

, где применение фармацевтической композиции в комбинации с ингибитором VEGF обеспечивает лечение рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(A3-1) применение по п. (A3), в котором ингибитор VEGF вводят до, одновременно или после введения фармацевтической композиции;

(A3-2) применение по п. (A3), в котором ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(A3-3) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-2), в котором ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения фармацевтической композиции или в тот же день, но до введения фармацевтической композиции;

(A3-4) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-3), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-

VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(A3-5) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-4), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(A3-6) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-8), где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(A3-11) применение по одному из п.п. (A3 или п. (A3-10), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(A3-12) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-11), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(A3-13) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-12), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(A3-14) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-13), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

(A3-15) применение по одному из п.п. (A3)-(A3-14), где из следующих вариантов осуществления изобретения (в которых предварительное введение ингибитора цитокинов осуществляют в каждом цикле дозирования связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела) синдром выброса цитокинов обусловлен

высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей:

(A4) применение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в комбинированной терапии с ингибитором VEGF, где комбинированная терапия предназначена для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(A4-1) применение по п. (A4), в котором в комбинированной терапии ингибитор VEGF вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A4-2) применение по п. (A4), в котором в комбинированной терапии ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A4-3)

применение по одному из п.п. (A4)-(A4-2), в котором в комбинированной терапии ингибитор VEGF вводят

(за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A4-4) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-3), где ингибитор VEGF(A4-3), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(A4-5) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-4), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(A4-6) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-5), в котором комбинированная терапия включает дополнительно введение ингибитора иммунных контрольных точек;

(A4-7) применение по п. (A4-6), в котором ингибитор иммунных контрольных точек выбирают из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(A4-8) применение по п. (A4-6) или п. (A4-7), в котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(A4-9) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-8), в котором в комбинированной терапии кортикостероид не вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A4-10) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-8), в котором в комбинированной терапии кортикостероид вводят дополнительно до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A4-11) применение по п. (A4-9) или п. (A4-10), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(A4-12) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-11), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(A4-13) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-12), где связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(A4-14) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-13где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

(A4-15) применение по одному из п.п. (A4)-(A4-14), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

Альтернативно этому, не ограничивающими объем настоящего изобретения вариантами осуществления изобретения являются следующие варианты:

(A5) способ лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов путем введения субъекту связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, где способ включает применение в комбинации ингибитора VEGF;

(A5-1) способ по п. (A5), в котором ингибитор VEGF вводят до , одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A5-2) способ по п. (A5), в котором ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A5-3)

способ по одному из п.п. (A5)-(A5-2),

, где ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A5-4) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-3), где VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(A5-5) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-4), где ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(A5-6) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-5), который включает дополнительно применение в комбинации ингибитора иммунных контрольных точек;

(A5-7) способ по п. (A5-6), в котором ингибитор иммунных контрольных точек выбирают из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(A5-8) способ по п. (A5-6) или п. (A5-7), в котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(A5-9) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-8), где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

A5-10) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-8), где кортикостероид вводят дополнительно до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(A5-11) способ по п. (A5-9) или п. (A5-10), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(A5-12) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-11), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(A5-13) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-12), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(A5-14) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-13), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела; и

(A5-15) способ по одному из п.п. (A5)-(A5-14), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

Альтернативно этому, настоящее описание включает следующие варианты осуществления изобретения:

(Б1) фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор VEGF, где композиция предназначена для предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(Б1-1) фармацевтическая композиция по (Б1), в которой ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(Б1-2) фармацевтическая композиция по п. (Б1) или п. (Б1-1), в которой ингибитор VEGF выбран из группы, состоящей из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(Б1-3) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1)-(Б1-2), которая предназначена для применения в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек;

(Б1-4) фармацевтическая композиция по (Б1-3), где ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(Б1-5) фармацевтическая композиция по п. (Б1-3) или п. (Б1-4), где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(Б1-6) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1)-(Б1-5), которая предназначена для применения в комбинированной терапии вместе со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела;

(Б1-7) фармацевтическая композиция по п. (Б1-6), которая предназначена для введения до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б1-8) фармацевтическая композиция по п. (Б1-6), которая предназначена для введения до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б1-9) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1-6)-(Б1-8), которая предназначена для введения за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или за 1 день до связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б1-10) фармацевтическая композиция по одному из (Б1-6)-(Б1-9), где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б1-11) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1-6)-(Б1-9), где кортикостероид вводят дополнительно до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б1-12) фармацевтическая композиция по п. (Б1-10) или п. (Б1-11), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное.

(Б1-13) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1-6)-(Б1-12), где связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена; (Б1-14) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1-6)-(Б1-13), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(Б1-15) фармацевтическая композиция по одному из п.п.(Б1-6) -(Б1-14), где ее применение в комбинации со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела предназначено для лечения рака, с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов.

(Б1-16) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1-6)-(Б1-15), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела; и

(Б1-17) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (Б1-6)-(Б1-16), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

Альтернативно этому, в не ограничивающем объем изобретения варианте осуществления изобретения, представленном в настоящем описании, предложены:

(Б2) набор, содержащий (I) контейнер, (II) фармацевтическую композицию в контейнере, где композиция содержит ингибитор VEGF, и (III) документ, включающий инструкцию по введению фармацевтической композиции для предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(Б2-1) набор по (Б2), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(Б2-2) набор по п. (Б2) или п. (Б2-1), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(Б2-3) набор по п. п. (Б2)-(Б2-2), дополнительно содержащий документ с инструкцией по применению фармацевтической композиции в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек;

(Б2-4) набор по п. (Б2-3), где ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(Б2-5) набор по п. (Б2-3) или п. (Б2-4), где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(Б2-6) набор по одному из п.п. (Б2)-(Б2-5), дополнительной содержащий документ с инструкцией по применению фармацевтической композиции в комбинации со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела;

(Б2-7) набор по п. (Б2-6), дополнительно содержащий документ с инструкцией по введению фармацевтической композиции до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б2-8) набор по п. (Б2-6), дополнительно содержащий документ с инструкцией по введению фармацевтической композиции до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б2-9) набор по одному из п.п. (Б2-6)-(Б2-8), дополнительно содержащий документ с инструкцией по введению фармацевтической композиции за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б2-10) набор по одному из п.п. (Б2-6)-(Б2-9), дополнительно содержащий документ с инструкцией не вводить кортикостероид до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б2-11) набор по одному из п.п. (Б2-6)-(Б2-9), дополнительно содержащий документ с инструкцией о дополнительном введении кортикостероида до,

одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б2-12) набор по одному из п.п. (Б2-10)-(Б2-11), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(Б2-13) набор по одному из п.п. (Б2-6)-(Б2-12), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(Б-14) набор по одному из п.п. (Б2-6)-(Б2-13), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(Б2-15) набор по одному из п.п. (Б2-6)-(Б2-14), где совместное применение фармацевтической композиции и связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела предназначено для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(Б2-17) набор по одному из п.п. (Б2)-(Б2-16), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей;

(Б2-18) набор по одному из п.п. (Б2)-(Б2-17), где назначение фармацевтической композиции осуществляют согласно инструкциям в документе;

(Б3) применение ингибитора VEGF для приготовления фармацевтической композиции, предназначенной для предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(Б3-1) применение по п. (Б3), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(Б3-2) применение по п. (Б3) или (Б3-1), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(Б3-3) применение по одному из п.п. (Б3)-(Б3-2), в котором фармацевтическую композицию применяют в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек;

(Б3-4) применение по п. (Б3-3), в котором ингибитор иммунных контрольных точек выбирают из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(Б3-5) применение по п. (Б3-3) или п. (Б3-4), в котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(Б3-6) применение по одному из п.п. (Б3)-(Б3-5), в котором фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинированной терапии с вместе со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела;

(Б3-7) применение по п. (Б3-6), в котором фармацевтическую композицию вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б3-8) применение по п. (Б3-6), в котором фармацевтическую композицию вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела; (Б3-9) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-8), в котором фармацевтическую композицию вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(б3-10) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-9),

где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б3-11) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-9), где кортикостероид вводят дополнительно до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б3-12) применение по п. (Б3-10) или п. (Б3-11), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(Б3-13) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-12), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(Б3-14) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-13), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(Б3-15) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-14), в котором комбинированная терапия, включающая использование фармацевтической композиции и связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, предназначена для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов

(Б3-16) применение по одному из п.п. (Б3-6)-(Б3-15), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

(Б3-17) применение по одному из п.п. (Б3)-(Б3-16), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей;

(Б4) применение ингибитора VEGF для предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(Б4-1) применение по п. (Б4), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы; (Б4-2) применение по п. (Б4) или п. (Б4-1), в

котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(Б4-3) применение по одному из п.п. (Б3)-(Б3-2), в котором ингибитор VEGF применяют в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек;

(Б4-4) применение по п. (Б4-3), в котором ингибитор иммунных контрольных точек выбирают из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(Б4-5) применение по п. (Б4-3) или п. (Б4-4), в котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(Б4-6) применение по одному из п.п. (Б4)-(Б4-5), в котором ингибитор VEGF предназначен для применения в комбинации вместе со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела;

(Б4-7) применение по п. (Б4-6), в котором ингибитор VEGF вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б4-8) применение по п. (Б4-6), в котором ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела; (Б4-9) (Б4-9) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-8), в котором ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или за 1 день до связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б4-10) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-9),

, где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(Б4-11) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-9), в котором кортикостероид дополнительно вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б4-12) применение по п. (Б4-10) или п. (Б4-11), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(Б4-13) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-12), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(Б4-14) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-13), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(Б4-15) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-14), в котором использование ингибитора VEGF в комбинации со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела предназначено для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(Б4-14) применение по одному из п.п. (А9)-(А9-18), предназначенная для лечения рака, при этом, предупреждая или ослабляя синдром выброса цитокинов, ассоциированный с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

(Б4-16) применение по одному из п.п. (Б4-6)-(Б4-15), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б4-17) применение по одному из п.п. (Б4)-(Б4-16), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

Альтернативно этому, не ограничивающими объем настоящего изобретения вариантами осуществления изобретения являются следующие варианты:

(Б5) способ предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов, где способ включает введение субъекту ингибитора VEGF;

(Б5-1) способ по п. (Б5), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2

антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(Б5-2) способ по п. (Б5) или п. (Б5-1), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(Б5-3) способ по одному из п.п. (Б5)-(Б5-2), в котором синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б5-4) способ по п. (Б5-3), в котором ингибитор VEGF вводят субъекту до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(

(Б5-5) способ по п. (Б5-3), в котором ингибитор VEGF вводят субъекту до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б5-6) способ по одному из п.п. (Б5-3)-(Б5-5), в котором ингибитор VEGF вводят субъекту за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или за 1 день до связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(Б5-7) способ по одному из п.п. (Б5-3)-(Б5-6), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена; (Б5-8) способ по одному из п.п. (Б5-3)-(Б5-7), где связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(Б5-9) способ по одному из п.п. (Б5)-(Б5-8), предназначенный для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов; и

(Б5-10) способ по п. (Б5-9), в котором синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

Альтернативно этому, не ограничивающими объем настоящего изобретения вариантами осуществления изобретения являются следующие варианты:

(В1) способ лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов, где способ включает введение субъекту связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF;

(В1-1) способ комбинированной терапии для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов, где способ включает введение субъекту связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF;

(В1-2) способ по п. (В1) или п. (В1-1) в котором ингибитор цитокинов вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(В1-3) способ по одному из п.п. (В1)-(В1-2), в котором ингибитор VEGF вводят субъекту до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(В1-4) способ по одному из п.п. (В1)-(В1-3), в котором ингибитор VEGF вводят субъекту за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или за 1 день до связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(В1-5) способ по одному из п.п. (В1)-(В1-4), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(B1-6) способ по п. одному из п.п. (B1)- (B1-5), в котором ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(B1-7) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-6), который дополнительно включает введение субъекту ингибитора иммунных контрольных точек;

(B1-8) способ по п. (B1-7), в котором ингибитор иммунных контрольных точек выбирают из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(B1-9) способ по п. (B1-7) или п. (B1-8), в котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(B1-10) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-9), в котором кортикостероид не вводят субъекту до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B1-11) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-9), который дополнительно включает введение кортикостероида субъекту до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B1-12) способ по п. (B1-10) или п. (B1-11), в котором кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(B1-13) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-12), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(B1-14) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-13), в котором связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(B1-15) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-14), в котором синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела; и

(B1-16) способ по одному из п.п. (B1)-(B1-15), в котором синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей. Не ограничивающий объем изобретения вариант осуществления изобретения, представленный в настоящем описании, относится к комбинированным терапиям, указанным в различных вариантах осуществления изобретения, представленным в настоящем описании, которые включают введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF; способам лечения рака с помощью комбинированных терапий; и способам, направленным на решение любой одной задачи или их комбинации, выбранной из предупреждения, ослабления и лечения с помощью комбинированных терапий синдрома выброса цитокинов, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

Альтернативно этому, в не ограничивающем объем изобретения варианте осуществления изобретения, представленном в настоящем описании, предложены:

(B2) комбинированная терапия, для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов, где терапия включает применение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF

(B2-1) комбинированная терапия по п. (B2), в которой ингибитор VEGF вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B2-2) комбинированная терапия по п. (B2) или п. (B2-1), в которой ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B2-3) комбинированная терапия по п. (B2) или п. (B2-1), в которой ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или за 1 день до связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела или в тот же день, но до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B2-4) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-3), в которой ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов цитокинов, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1

антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(B2-5) комбинированная терапия по п. одному из п.п. (B2)- (B2-4), в которой ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(B2-6) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-5), которая дополнительно включает применение в комбинации ингибитора иммунных контрольных точек;

(B2-7) комбинированная терапия по п. (B2-6), в которой ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(B2-8) комбинированная терапия по п. (B2-6) или п.(B2-7), в которой ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(B2-9) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-8), в которой кортикостероид не вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B2-10) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-8), в которой кортикостероид дополнительно вводят до, одновременно или после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B2-11) комбинированная терапия по п. (B2-9) или п. (B2-10), в которой кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(B2-12) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-11), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(B2-13) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-12), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(B2-14) комбинированная терапия по одному из п.п. (B2)-(B2-13), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B2-15) комбинированная терапия одному из п.п. (B2)-(B2-14), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей; (B3) фармацевтическая композиция, содержащая связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела и ингибитор VEGF, где композиция предназначена для лечения рака с одновременным предупреждением и/или ослаблением, и/или лечением синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов;

(B3-1) фармацевтическая композиция по п. (B3), в которой ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов цитокинов, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы;

(B3-2) фармацевтическая композиция по п. (B3) или п.(B3-1), в которой ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта;

(B3-3) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-2), где дополнительно используют в комбинации ингибитор иммунных контрольных точек;

(B3-4) фармацевтическая композиция по п. (B3-3), где ингибитор иммунных контрольных точек выбран из антитела к PD1, антитела к PD-L1 и антитела к PD-L2;

(B3-5) фармацевтическая композиция по п. (B3-3) или п. (B3-4), где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой атезолизумаб;

(B3-6) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-5), где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции;

(B3-7) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-5), где кортикостероид дополнительно вводят до, одновременно или после введения фармацевтической композиции;

(B3-8) фармацевтическая композиция по п. (B3-6) или п. (B3-7), где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное;

(B3-9) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-8), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена;

(B3-10) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-9), в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора;

(B3-11) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-10), где синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов ассоциированы с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела;

(B3-12) фармацевтическая композиция по одному из п.п. (B3)-(B3-11), где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей; и

(B4) комбинация связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF.

Эффекты изобретения

Связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, которые связываются с такими Т-клеточными антигенами, как CD3, привлекают внимание в качестве новых средств лечения рака, в которых используются противоопухолевые действия Т-клеток, присутствующих в живых организмах. Однако, известно, что поскольку их мишенью являются Т-клетки, которые продуцируют цитокины, то могут возникать нежелательные реакции из-за производства цитокинов (например, синдром

выброса цитокинов, CRS). Таким образом, существует озабоченность в отношении непредвиденных нежелательных реакций, вызываемых производством цитокинов, при введении связывающихся с Т-клеточным антигеном молекул антител. При создании настоящего изобретения связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела вводили в комбинации с ингибитором VEGF заранее спланированным образом; таким путем можно было предупреждать или ослаблять непредвиденные нежелательные реакции, вызываемые цитокинами.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 – воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на лекарственную эффективность суррогатного антитела (антитела-аналога) ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложен объем опухоли ($мм^3$), а на горизонтальной оси отложено количество дней после трансплантации опухоли, где день трансплантации опухоли обозначен как день 0;

на фиг. 2-А - воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолью цитокина (IL-6), вызываемое антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложена концентрация в плазме (пг/мл) IL-6, на горизонтальной оси отложены ингредиенты, которые вводили мышам, и «combo» обозначает совместное применение двух ингредиентов. В верхней части графика указано время, прошедшее после введения, где момент времени введения активных ингредиентов обозначен как 0;

на фиг. 2-Б - воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолью цитокина (TNF), вызываемое антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложена концентрация в плазме (пг/мл) TNF, на горизонтальной оси отложены ингредиенты, которые вводили мышам, и «combo» обозначает совместное применение двух ингредиентов. В верхней части графика указано время, прошедшее после введения, где момент времени введения активных ингредиентов обозначен как 0;

на фиг. 2-В - воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолью цитокина (IFNгамма), вызываемое антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложена концентрация в плазме (пг/мл) IFNγ, на горизонтальной оси отложены ингредиенты, которые вводили мышам, и «combo» обозначает совместное применении

двух ингредиентов. В верхней части графика указано время, прошедшее после введения, где момент времени введения активных ингредиентов обозначен как 0;

на фиг. 2-Г - воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолью цитокина (CXCL9, лиганд 9 хемокина), вызываемое антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложена концентрация в плазме (пг/мл) лиганда 9 CXC, на горизонтальной оси отложены ингредиенты, которые вводили мышам, и «combo» обозначает совместное применении двух ингредиентов. В верхней части графика указано время, прошедшее после введения, где момент времени введения активных ингредиентов обозначен как 0;

на фиг. 2-Д - воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолью цитокина (CXCL10), вызываемое антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложена концентрация в плазме (пг/мл) CXCL10, на горизонтальной оси отложены ингредиенты, которые вводили мышам, и «combo» обозначает совместное применении двух ингредиентов. В верхней части графика указано время, прошедшее после введения, где момент времени введения активных ингредиентов обозначен как 0;

на фиг. 3 – воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство цитокинов здоровыми тканями, вызываемое антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11). На этом чертеже на вертикальной оси отложена концентрация в плазме (пг/мл) IL-6 (вверху слева), TNFα (вверху справа), IFNγ (в средине слева), IL-2 (в середине справа), CXCL9 (снизу слева) или CXCL10 (внизу справа) через 2 ч после введения, а на горизонтальной оси отложены вводимые активные ингредиенты;

на фиг. 4 - последовательности вариабельных областей легких цепей и их различная нумерация согласно Kabat и др.

Описание вариантов осуществления изобретения

I. Определения

Представленные ниже определения даны с целью ослабления понимания настоящего изобретения.

Специфичность

Понятие «специфичность» означает, что одна из молекул, участвующих в специфическом связывании, не обладает какой-либо значимой способностью связываться с молекулами, отличными от одного или нескольких партнеров по

связыванию молекул. Кроме того, понятие используют также, когда домен, содержащий вариабельную область антитела, является специфическим в отношении конкретного эпитопа из нескольких эпитопов в антигене. Когда эпитоп, с которым связывается домен, содержащий вариабельную область антитела, входит в несколько различных антигенов, то антигенсвязывающие молекулы, содержащие домен, включающий вариабельную область антитела, могут связываться с различными антигенами, которые содержат эпитоп.

Связывающая активность (активность связывания)

Понятие «связывающая активность (активность связывания) относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним или несколькими сайтами связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания «связывающая активность» не ограничена строго взаимодействием по типу 1:1 между компонентами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Например, когда взаимодействие между компонентами связывающейся пары соответствует одновалентному взаимодействию по типу 1:1, то связывающую активность обозначают конкретно как присущую им аффинность связывания (аффинность). Когда компонент связывающейся пары обладает способностью и к одновалентному связыванию, и к многовалентному связыванию, то связывающая активность представляет собой сумму всех сил связывания. Связывающую активность молекулы X в отношении ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (KD) или «количества аналита, связывающегося с единицей количества лиганда» (ниже в контексте настоящего описания можно обозначать как «связывающееся количество»). Специалистам в данной области должно быть очевидно, что, как правило, более низкая величина константы диссоциации (KD) означает более высокую связывающую активность; и более высокая величина «количества аналита, связывающегося с единицей количества лиганда» или «связывающегося количества» означает более высокую связывающую активность. Связывающую активность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной области, включая те, которые представлены в настоящем описании. Ниже описаны иллюстративные и приведенные в качестве примера варианты измерения связывающей активности (включая аффинность). Ниже описаны иллюстративные и приведенные в качестве примера варианты измерения аффинности связывания.

Связывающаяся «с антигеном-мишенью» антигенсвязывающая молекула антитела

Понятия «связывающаяся с антигеном-мишенью антигенсвязывающая молекула антитела» (в настоящем описании «антиген-мишень» представляет собой любой антигенный белок, который может являться мишенью, и его примеры включают Т-клеточный антиген, раковый антиген, цитокин и рецептор цитокина) и «антигенсвязывающая молекула, которая связывается с антигеном-мишенью», относятся к антигенсвязывающей молекуле, которая обладает способностью связываться с антигеном-мишенью с аффинностью, достаточной для того, чтобы антигенсвязывающую молекулу можно было применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента, когда антигенсвязывающая молекула таргетирует антиген. В одном из вариантов осуществления уровень связывания антигенсвязывающей молекулы с неродственным белком, не представляющим собой антиген-мишень, составляет менее чем примерно 10% от связывания антигенсвязывающей молекулы с антигеном-мишенью по данным измерений, полученным, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, которая связывается с белком-мишенью, имеет константу диссоциации (Kd) 1мкМ или менее, 100нМ или менее, 10нМ или менее, 1нМ или менее, 0,1нМ или менее, 0,01нМ или менее или 0,001нМ или менее (например, 10^{-8}М или менее, например, от 10^{-8}М до 10^{-13}М, например, от10^{-9}М до 10^{-13}М). В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула связывается с эпитопом антигена-мишени, который является консервативным для антигена-мишени из различных видов.

Антигенсвязывающая молекула, «которая связывается с тем же эпитопом», что и антигенсвязывающая референс-молекула

Антигенсвязывающая молекула, «которая связывается с тем же эпитопом», что и антигенсвязывающая референс-молекула, относится к антигенсвязывающей молекуле, которая блокирует связывание антигенсвязывающей референс-молекулы с ее антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более, и наоборот, антигенсвязывающая референс-молекула блокирует связывание антигенсвязывающей молекулы с ее антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более. Пример анализа в условиях конкуренции представлен в настоящем описании.

В качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный антиген (например, GPC3, CD3 и/илиVEGF) инкубируют в растворе, содержащем первую меченую антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с антигеном, и вторую

немеченую антигенсвязывающую молекулу, подлежащую тестированию в отношении ее способности конкурировать с первой антигенсвязывающей молекулой за связывание с антигеном. Вторая антигенсвязывающая молекула может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первую меченую антигенсвязывающую молекулу, но не вторую немеченую антигенсвязывающую молекулу. После инкубации в условиях, приемлемых для связывания первой антигенсвязывающей молекулы с антигеном, избыток несвязанной антигенсвязывающей молекулы удаляют и измеряют количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижается в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что вторая антигенсвязывающая молекула конкурирует с первой антигенсвязывающей молекулой за связывание с антигеном (см., например, Harlow и Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, глава 14, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

Антигенсвязывающая молекула

В контексте настоящего описания понятие «антигенсвязывающая молекула» используется в его наиболее широком смысле и относится к различным структурам антител, включая (но не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), производные антител и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало известные в данной области и легко доступные дополнительные небелковые фрагменты (которые обозначают как «производные антитела»). Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но не ограничиваясь только ими) водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(*н*-винилпиролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры

пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликоль пропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться и, если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антитела, подлежащие усовершенствованию, предполагается ли применение производного антитела в терапии в определенных условиях и т.д.

Фрагмент антитела

Понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают (но не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; димерные антитела (диабоди); линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референс-антитело

Понятие «антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и референс-антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание референс-антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более и/или, наоборот, референс-антитело блокирует связывание антитела с его антигеном при оценке с помощью анализа в условиях конкуренции на 50% или более. Пример анализа в условиях конкуренции представлен в настоящем описании.

Химерное антитело

Понятие «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или вида.

Класс антитела

Понятие «класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, который/которая входит в его тяжелую цепь. Известно пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно

подразделять дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно.

Константные области изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 обозначают как Cγ1, Cγ2, Cγ3 и Cγ4 соответственно. Аминокислотные последовательности полипептидов Fc-областей, образующих человеческие Cγ1, Cγ2, Cγ3 и Cγ4, представлены в качестве примера в SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 26 соответственно. Соответствие между аминокислотными остатками, образующими каждую аминокислотную последовательность, и EU-нумерацией по Кэботу (обозначенную также в настоящем описании как EU-индекс), представлено на фиг 1.

Fc-область

Понятие «Fc-область» в контексте настоящего описания относится к С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие включает нативную последовательность Fc-областей и вариант Fc-областей. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) или глицин-лизин (Gly446-Lys447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Fc-рецептор

Понятие «Fc-рецептор» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG-типа (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII, включая аллельные варианты и полученные в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Рецепторы Fc-гамма RII включают Fc-гамма RIIA («активирующий рецептор») и Fc-гамма RIIB

(«ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся прежде всего их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc-гамма RIIA содержит активирующие мотивы на основе тирозина иммунорецептора (ITAM) в его цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc-гамма RIIB содержит ингибирующий мотив на основе рецептора тирозина иммунорецептора (ITIM) в его цитоплазматическом домене (см., например, Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15, 1997, сс. 203-234). Обзор сведений о FcR представлен, например, у Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492; Capel и др., Immunomethods 4, 1994, сс. 25-34 и de Haas и др., J. Lab. Clin. Med. 126, 1995, сс. 330-341. Под понятие «FcR», указанное в настоящем описании, подпадают и другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем.

Понятие «Fc-рецептор» или «FcR» включает также неонатальный рецептор, FcRn, который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., J. Immunol. 117, 1976, сс. 587-593 и Kim и др., J. Immunol. 24, 1994, сс. 2429-2434) и регулирование гомеостаза иммуноглобулинов. Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie и Ward., Immunol. Today 18(12), 1997, сс. 592-598; Ghetie и др., Nature Biotechnology 15(7), 1997, сс. 637-640; Hinton и др., J. Biol. Chem. 279(8), 2004, сс. 6213-6216; WO 2004/92219 (на имя Hinton и др.).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и время полужизни в плазме человеческого FcRn, отличающегося высокой аффинностью связывания с полипептидами, можно оценивать, например, на трансгенных мышах или на трансфектированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или в приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (на имя Presta) описаны варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, также у Shields и др., J. Biol. Chem. 9(2), 2001, сс. 6591-6604).

Содержащее Fc-область антитело

Понятие «содержащее Fc-область антитело» относится к антителу, которое содержит Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе EU-нумерации) или С-концевой глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области может быть удален, например, в процессе очистки антитела или при рекомбинантном конструировании нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Таким образом, композиция, которая содержит антитело, имеющее Fc-область, предлагаемое в настоящем изобретении,

может содержать антитело с G446-K447, с G446 и без K447, со всеми удаленными G446-K447 или смесь из трех описанных выше типов антител.

Fc-области с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-рецептора включают Fc-области с пониженной связывающей активностью в отношении любого из Fcγ-рецепторов FcγI, FcγIIA, FcγIIB, FcγIIIA и/или FcγIIIB. Пониженную связывающую активностью в отношении любого из Fcγ-рецепторов FcγI, FcγIIA, FcγIIB, FcγIIIA и/или FcγIIIB можно оценивать с помощью известных специалистам в данной области форматов FACS и ELISA, а также ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции) и метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010).

Антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-рецептора, включают антигенсвязывающие молекулы или антитела с пониженной эффекторной функцией. Антигенсвязывающие молекулы или антитела с пониженной эффекторной функцией включают молекулы с заменой одного или нескольких следующих остатков Fc-области, таких как 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (см., например, US № 6737056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве из следующих аминокислотных положений: 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант «DANA» Fc-области, несущий замену остатков 265 и 297 на аланин (US № 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, US № 6737056; WO 2004/056312 и Shields и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вариант антитела содержит Fc-область с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 в Fc-области (EU-нумерация остатков).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в Fc-области осуществляют изменения, которые приводят к измененной (т.е. либо повышенной, либо пониженной) способности связывать C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), что описано, например, в US № 6194551, WO 1999/51642 и у Idusogie и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-области с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-рецептора включают Fc-мутантов Fc-областей, которые в качестве иллюстрации представлены в настоящем описании.

Каркасный участок

Понятие «каркасный участок» или «FR», означает остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельного участка (HVR). FR вариабельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, имеют следующее расположение в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Полноразмерное антитело

Понятия «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически сходную с нативной структурой антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат представленную в настоящем описании Fc-область.

Клетка-хозяин

Понятия «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используют взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство безотносительно к количеству пересевов. Потомство может не быть полностью идентичным по составу нуклеиновых кислот родительской клетке, но может содержать мутации. Понятие включает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отбора у исходной трансформированной клетки.

Человеческое антитело

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или человеческими клетками, или имеющее происхождение из нечеловеческого источника, в котором использован спектр человеческих антител или другие кодирующие человеческое антитело последовательности. Из указанного определения человеческого антитела специально

исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

Человеческий консенсусный каркасный участок

«Человеческий консенсусный каркасный участок» представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., публикация NIH 91-3242, Bethesda MD, т.т. 1-3, 1991. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I согласно Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

Гуманизированное антитело

Понятие «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, имеющей происхождение из человеческого антитела. Понятие «гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергли гуманизации.

Гипервариабельный участок

Понятие «гипервариабельный участок», «HVR» или «CDR» в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными («определяющие комплементарность участки» или «CDR») и/или формируют петли определенной структуры («гипервариабельные петли»), и/или содержат контактирующие с антигеном

остатки («контакты с антигеном»). Как правило, антитела содержат шесть CDR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Примеры CDR включают

(а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD,1991);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745); и

(г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, то остатки в CDR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) нумеруют согласно Kabat и др., выше.

Индивидуум

«Индивидуум», «субъект» или «пациент» представляет собой млекопитающее. К млекопитающим относятся (но не ограничиваясь только ими) одомашненные животные (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматы (например, люди и приматы кроме человека, например, обезьяны), кролики и грызуны (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум или субъект представляет собой человека.

Выделенная антигенсвязывающая молекула

«Выделенная» антигенсвязывающая молекула представляет собой молекулу, которая отделена от компонента ее естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающую молекулу очищают до чистоты, превышающей 95% или 99% по данным, например, электрофоретических анализов (таких, например, как ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических анализов (таких, например, как ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, у Flatman и др., J. Chrom. B 848, 2007, сс. 79-87.

Выделенная нуклеиновая кислота

«Выделенная» нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает также молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая в норме включает молекулу нуклеиновой кислоты, но в которой молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в которой ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу

«Понятие «выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу» относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих одну или две, или большее количество полипептидных цепей или их фрагментов антигенсвязывающей молекулы (в случае антитела тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая указанную(ые) молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т) в одном векторе или в различных векторах, и указанная(ые) молекула(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т) присутствуют в одном или нескольких положениях в клетке-хозяине.

Моноклональное антитело

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих мутации, встречающиеся в естественных условиях или возникающие в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, прилагательное «моноклональный» определяет особенность антитела, характеризуя его как полученное из практически гомогенной популяции антител, а не сконструированное в соответствии с требованиями к получению антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, моноклональные антитела, которые можно применять согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью различных технологий, включая (но не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы, основанные на

использовании трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, указанные методы и другие, приведенные в качестве примера методы получения моноклональных антител, представлены в настоящем описании.

Листовка-вкладыш в упаковку

Понятие «листовка-вкладыш в упаковку» относится к инструкциям, которые обычно входят в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, которые связаны с применением указанных терапевтических продуктов.

Идентичность аминокислотной последовательности

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивая последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве компонента при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) или GENETYX® (фирма Genetyx Co., Ltd.) Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Авторство компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит фирме Genentech, Inc., и исходный код был представлен в комплекте с документацией для пользователей в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать на основе исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую систему UNIX V4.0D. Все параметры, требуемые для

сравнения последовательностей, устанавливаются программой ALIGN-2 и не должны изменяться.

В ситуациях, в которых ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А по сравнению с или относительно данной аминокислотной последовательности Б (что в альтернативном варианте можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с или относительно данной аминокислотной последовательности Б), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{дробь } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения при оценке с помощью программы для сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2, где с помощью программы осуществляли сравнение А и Б, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотных последовательностей А относительно Б не может быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно А. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

Фармацевтическая композиция Понятие «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность входящего в ее состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и которая не содержит дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

Фармацевтически приемлемый носитель

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Лечение

В контексте настоящего описания понятие «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «процесс лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Вариабельная область

Понятие «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., Kuby Immunology, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., J. Immunol. 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628).

Вектор

Понятие «вектор» в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они

функционально связаны. Указанные векторы в контексте настоящего описания обозначают как «экспрессионные векторы».

Мультиспецифическое антитело

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула (или антитело), указанная в настоящем описании, представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичности, связывающиеся по меньше мере с двумя различными сайтами. Мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Методики создания мультиспецифических антител включают (но не ограничиваясь только ими) рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелых цепей-легких цепей иммуноглобулинов, обладающих различными специфичностями (см. Milstein и Cuello, Nature 305, 1983, с. 537, WO 93/08829 и Traunecker и др., EMBO J. 10 ,1991, с. 3655), и технологию «knob-in-hole» (обеспечение взаимодействия по типу «выступ-во впадину», см., например, US № 5731168). Мультиспецифические антитела можно получать также путем создания регулируемых электростатических воздействий для получения молекул антител с гетеродимерными Fc (WO 2009/089004); перекрестного связывания двух или большего количества антител или фрагментов (см. US № 4676980 и Brennan и др., Science 229, 1985, с. 81); применения лейциновых молний для получения биспецифических антител (см. Kostelny и др., J. Immunol. 148, 1992, сс. 1547-1553); применения технологии «димерных антител» для создания фрагментов биспецифических антител (см. Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448); и применения димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см. Gruber и др., J. Immunol. 152, 1994, с. 5368); и получения триспецифических антител согласно методу, описанному, например, у Tutt и др., J. Immunol. 147, 1991, с. 60).

Под объем настоящего изобретения подпадают также сконструированные антитела с тремя или большим количеством функциональных антигенсвязывающих центров, включая «антитела-осьминоги» (см., например, US 2006/0025576A1).

Антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент может включать также «Fab двойного действия» или «DAF», содержащий антигенсвязывающий центр, который связывается со специфическим антигеном, а также с другим, отличным от него антигеном (см., например, US 2008/0069820).

II. Связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител и фармацевтические композиции

В одном из вариантов осуществления изобретения понятие «связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител» относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с антигенами на Т-клетках, и включают антигенсвязывающие молекулы антитела, которые связываются с комплексами Т-клеточного рецептора. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител представляют собой мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител представляют собой биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предпочтительно биспецифические антитела, которые содержат «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора» и «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена». В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифические антитела могут иметь структуру одноцепочечного антитела, например, структуру, в которой вариабельные области антитела сцеплены с помощью линкеров. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител содержат также Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора.

Кроме того, в одном из вариантов осуществления изобретения домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, предпочтительно представляет собой домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора, и более предпочтительно домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении CD3. Кроме того, в одном из указанных выше вариантов осуществления изобретения «домен, содержащий вариабельную область антитела» представлен одним или несколькими вариабельными доменами антитела, и предпочтительно представляет собой домен, содержащий вариабельную область антитела, которая содержит вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH). Приемлемые примеры указанных доменов, содержащих вариабельные области, включают различные

фрагменты антител, такие как «scFv (одноцепочечный Fv)», «одноцепочечное антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv 2 (scFv2)», «Fab» и «F(ab')2».

Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена

В контексте настоящего описания фраза «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена», относится к участку антитела, содержащему область, которая специфически связывается со всем раковым антигеном или с его частью, и является комплементарной всему раковому антигену или его части.

Ракоспецифический антиген

В настоящем описании понятие «ракоспецифический антиген» относится к антигену, экспрессируемому раковыми клетками, который позволяет различать раковые клетки и здоровые клетки; и, например, оно включает антигены, которые экспрессируются, когда клетка превращается в злокачественную, и аномальные сахарные цепи, возникающие на белковых молекулах или на клеточной поверхности, когда клетки превращаются в раковые клетки. Конкретными примерами являются GPC3; рецептор ALK (рецептор плейотрофина); плейотрофин; антиген карциномы поджелудочной железы KS 1/4; антиген карциномы яичника (CA125); простатическая кислая фосфатаза; простатспецифический антиген (PSA); меланома-ассоциированный антиген p97; антиген меланомы gp75; высокомолекулярный антиген меланомы (HMW-MAA); простатспецифический мембранный антиген; карциноэмбриональный антиген (CEA); антиген полиморфного эпителиального муцина; антиген жировых глобул человеческого молока; ассоциированные с колоректальной опухолью антигены, такие как CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 и LEA; антиген лимфомы Беркитта 38.13; CD19; антиген B-лимфомы человека CD20; CD33; специфические для меланомы антигены, такие как ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2 и ганглиозид GM3; опухольспецифический антиген клеточной поверхности трансплантационного типа (TSTA); антигены опухолей, индуцированных вирусами, включая T-антиген и оболочечные антигены ДНКовых опухолевых вирусов и РНКовых опухолевых вирусов; CEA ободочной кишки; онкофетальные антигены, такие как онкофетальный трофобластный гликопротеин 5T4 и онкофетальный антиген мочевого пузыря; α-фетопротеин; дифференцировочные антигены, такие как антигены человеческой карциномы легкого L6 и L20; антигены фибросаркомы; антиген T-клеточного лейкоза человека Gp37; неогликопротеин; сфинголипиды; антигены рака молочной железы,

такие как EGFR (рецептор эпидермального фактора роста); NY-BR-16; антигены NY-BR-16 и HER2 (p185HER2); полиморфный эпителиальный муцин (PEM); антиген злокачественных человеческих лимфоцитов APO-1; дифференцировочные антигены, такие как антиген I, обнаруженный в фетальных эритроцитах; антиген I первичной эндодермы, обнаруженный в эритроцитах взрослых; преимплантированный эмбрион; I(Ma), обнаруженный при раке желудка; M18 и M39, обнаруженные в эпителии молочной железы; SSEA-1, VEP8, VEP9, Myl и VIM-D5, обнаруженные в миелоидных клетках; D156-22, обнаруженный при колоректальном раке; TRA-1-85 (группа крови H); SCP-1, обнаруженный при раке яичек и яичника; C14, обнаруженный при раке ободочной кишки; F3, обнаруженный при раке легкого; AH6, обнаруженный при раке желудка; гаптен Y; Ley, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы; TL5 (группа крови A); рецептор EGF, обнаруженный в клетках A431; серия E1 (группа крови B), обнаруженная при раке поджелудочной железы; FC10.2, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы; антиген рака желудка; CO-514 (группа крови Lea), обнаруженный при аденокарциномах; NS-10, обнаруженный при аденокарциномах; CO-43 (группа крови Leb); G49, обнаруженный в рецепторе EGF клеток A431; MH2 (группа крови ALeb/Ley), обнаруженный при раке ободочной кишки; 19.9, обнаруженный при раке ободочной кишки; муцины при раке желудка; T5A7, обнаруженный в миелоидных клетках; R24, обнаруженные при меланоме; 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2 и M1:22:25:8, обнаруженные в клетках эмбриональной карциномы, а также SSEA-3 и SSEA-4, обнаруженные на стадиях 4-8-клеток развития эмбриона; антиген подкожной T-клеточной лимфомы; антиген MART-1; антиген сиалил Tn (STn); антиген рака ободочной кишки NY-CO-45; вариант A антигена рака легкого NY-LU-12; антиген аденокарциномы ART1; паранеопластический ассоциированный с раком головного мозга-яичек антиген (онконевральный антиген MA2; паранеопластический невральный антиген); нейро-онкологический вентральный антиген 2 (NOVA2); ген 520 антигена гемоцитарной карциномы; опухоль-ассоциированный антиген CO-029; опухоль-ассоциированные антигены MAGE-C1 (антиген рака яичек CT7), MAGE-B1 (антиген MAGE-XP), MAGE-B2 (DAM6), MAGE-2, MAGE-4a, MAGE-4b и MAGE-X2; антиген рака яичек (NY-EOS-1); YKL-40, фрагменты или структуры любого из указанных выше полипептидов, полученные путем их модификации (например, указанная выше модифицированная фосфатная группа или сахарная цепь); EpCAM; EREG; CA19-9; CA15-3; сиалил SSEA-1(SLX); HER2; PSMA; CEA; и CLEC12A. Ракоспецифические антигены, которые являются

мишенями связывающих ракоспецифический антиген доменов, предлагаемых в настоящем изобретении, представляют собой, в частности, антигены, которые экспрессируются на клеточной поверхности, и примеры таких ракоспецифических антигенов включают CD19, CD20, EGFR, HER2, EpCAM и EREG.

Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3 (GPC3)

В контексте настоящего описания фраза «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3 (GPC3)», относится к участку антитела, содержащему область, которая специфически связывается с указанным выше белком GPC3, либо с полным, либо с частью неполного пептида GPC3, а также является комплементарным им.

В контексте настоящего описания глипикан 3 (GPC3) представляет собой белок, который принадлежит к семейству глипиканов, т.е. группе гепаран-сульфат протеогликанов, сцепленных с клеточной поверхностью через гликозилфосфатидилинозитол (Filmus J. Clin. Invest., 108, 2001, сс. 497-501). Глипиканы играют важную роль в пролиферации, дифференцировке и миграции клеток GPC3 экспрессируется в 70 или более процентах тканей гепатомы, полученных при хирургическом иссечении или бипсии, и практически не экспрессируется или вообще не экспрессируется в соседних ненеопластических повреждениях печени и в большинстве тканей взрослых (Zhu-Zu-W., Gut, 48, 2001, сс. 558-564、Yamauchi, Mod. Pathol., 18, 2005, сс. 1591-1598).

Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора

В контексте настоящего описания фраза «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора», относится к участку антитела, связывающегося с комплексом Т-клеточного рецептора, содержащим область, которая специфически связывается со всем комплексом Т-клеточного рецептора или с его частью, а также является комплементарной им. Комплекс Т-клеточного рецептора может представлять собой сам Т-клеточный рецептор или адаптерную молекулу, образующую комплекс Т-клеточного рецептора вместе с Т-клеточным рецептором. CD3 является приемлемой адаптерной молекулой.

Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора

В контексте настоящего описания фраза «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора», относится к участку антитела, связывающегося с Т-клеточным рецептором, который содержит область, которая специфически связывается во всем Т-клеточным рецептором или его частью, а также является комплементарной им.

Участок Т-клеточного рецептора, с которым связывается домен, предлагаемый в настоящем изобретении, может представлять собой вариабельную область или константную область, но предпочтительным является эпитоп, присутствующий в константной области. Примеры последовательности константной области включают α-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq CAA26636.1 (SEQ ID NO: 9), β-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq C25777 (SEQ ID NO: 10), γ1-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq A26659 (SEQ ID NO: 11), γ2-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq AAB63312.1 (SEQ ID NO: 12), и δ-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq AAA61033.1 (SEQ ID NO: 13).

Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении CD3

В контексте настоящего описания фраза «домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении CD3», относится к участку антитела, связывающегося с CD3, который содержит область, которая специфически связывается во всем CD3 или его частью, а также является комплементарной им.

Домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении CD3, предлагаемый в настоящем изобретении, может представлять собой любой эпитоп-связывающий домен, если эпитоп присутствует в последовательности γ-цепи, δ-цепи или ε-цепи, образующей человеческий CD3. В настоящем изобретении предпочтительно можно применять домен, содержащий вариабельную область легкой цепи (VL) антитела к CD3 и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела к CD3, которые связываются с эпитопом, присутствующим во внеклеточной области ε-цепи комплекса человеческого CD3, является приемлемым. Помимо вариабельной области легкой цепи (VL) антитела к CD3 и вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела к CD3, которые описаны в

примерах, в качестве указанных доменов можно применять известные CD3-связывающие домены, которые содержатся в CD3-связывающей вариабельной области легкой цепи антитела (VL) и CD3-связывающей вариабельной области тяжелой цепи антитела (VH), а также присутствующие в антителе OKT3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1980, сс. 4914-4917). Так, можно применять соответственно содержащий вариабельную область антитела домен, полученный из антитела к CD3, обладающего требуемыми свойствами, для создания которого осуществляли иммунизацию требуемого животного с помощью описанного выше метода с использованием γ-цепи, δ-цепи или ε-цепи, образующей человеческий CD3. В качестве антитела к CD3 можно применять соответственно человеческие антитела и должным образом гуманизированные антитела, описанные выше, с получением домена, содержащего вариабельную область антитела, которая обладает CD3-связывающей активностью. Касательно структуры γ-цепи, δ-цепи или ε-цепи, образующей CD3, то их полинуклеотидные последовательности представлены в SEQ ID NO: 9 (NM_000073.2), 10 (NM_000732.4) и 11 (NM_000733.3), а их полипептидные последовательности представлены в SEQ ID NO: 12 (NP_000064.1), 13 (NP_000723.1) и 14 (NP_000724.1) (регистрационные номера RefSeq представлены в скобках).

Содержащие вариабельную область антитела домены в антигенсвязывающих молекулах, предлагаемых в настоящем изобретении, могут связываться с одним и тем же эпитопом. Согласно настоящему описанию один и тот же эпитоп может присутствовать в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 14. Альтернативно этому, содержащие вариабельную область антитела домены в антигенсвязывающих молекулах, предлагаемых в настоящем изобретении, могут связываться с различными эпитопами соответственно. Согласно настоящему описанию различные эпитопы могут присутствовать в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 14.

Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора

В одном из вариантов осуществления изобретения «пониженная связывающая активность в отношении Fcγ–рецептора» означает, например, что связывающая активность тестируемой антигенсвязывающей молекулы составляет 50% или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 20% или менее или 15% или менее и наиболее предпочтительно 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3%

или менее, 2% или менее или 1% менее, по сравнению со связывающей активностью контрольной антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающие молекулы антитела, содержащие Fc-область моноклонального антитела в виде IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-типа, можно использовать соответственно в качестве контрольных антигенсвязывающих молекул. Кроме того, когда антигенсвязывающую молекулу, содержащую мутантный Fc-область антитела конкретного изотипа, используют в качестве тестируемой субстанции, то воздействие мутации мутанта на активность связывания с Fcγ-рецептором оценивают с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы антитела, содержащей Fc-область такого же изотипа. Как описано выше, соответственно получают антигенсвязывающие молекулы антитела, содержащие мутантный Fc-область с доказанной пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора.

Такие известные мутанты включают, например, мутанты с делецией аминокислот 231A-238S (EU-нумерация) (WO 2009/011941), а также мутанты C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol 34, 2007, с. 11); C226S и C229S (Hum. Antibod. Hybridomas 1(1), 1990, сс. 47-54); C226S, C229S, E233P, L234V, и L235A (Blood 109, 2007, сс. 1185-1192).

В частности, предпочтительными антигенсвязывающими молекулами являются молекулы антитела, которые содержат Fc-домен с заменой аминокислоты в положении 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 или 332 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-область антитела конкретного изотипа. Изобретение не ограничено изотипом антитела, из которого получают Fc-область, и можно использовать соответствующий Fc-область, полученный из моноклонального антитела в виде IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-типа. Предпочтительно следует применять Fc-область, полученный из антител IgG1-типа. Предпочтительно применять Fc-области, имеющие происхождение из антител IgG1-типа.

Предпочтительными для применения антигенсвязывающими молекулами являются, например, молекулы антитела, которые содержат Fc-область, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяется согласно EU-нумерации (каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток

(после замены) **до замены**), среди аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG1-типа:

(а) L234F, L235E, P331S;

(б) C226S, C229S, P238S;

(в) C226S, C229S;

(г) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;

(д) L234A, L235A или L235R, N297A;

(е) L235A или L235R, S239K, N297A,

а также молекулы антитела, которые содержат Fc-область с делецией аминокислот в положениях 231-238.

Кроме того, предпочтительными для применения антигенсвязывающими молекулами являются также, например, молекулы, которые содержат Fc-область, содержащую одну из указанных ниже замен, положения которых определяют согласно EU-нумерации, среди аминокислотах, образующих Fc-область антитела IgG2-типа:

(ж) H268Q, V309L, A330S и P331S;

(з) V234A;

(и) G237A;

(к) V234A и G237A;

(л) A235E и G237A;

(м) V234A, A235E и G237A (каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены).

Кроме того, предпочтительными для применения антигенсвязывающими молекулами являются также, например, молекулы антитела, которые содержат Fc-область, содержащую одну из указанных ниже замен, положения которых определяют согласно EU-нумерации, среди аминокислотах, образующих Fc-область антитела IgG3-типа:

(н) F241A;

(о) D265A;

(п) V264A, каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный

символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток(после замены) **до замены**.

Кроме того, предпочтительными для применения антигенсвязывающими молекулами являются также, например, молекулы антитела, которые содержат Fc-область, содержащую одну из указанных ниже замен, положения которых определяют согласно EU-нумерации, среди аминокислотах, образующих Fc-область антитела IgG4-типа:

(р) L235A, G237A и E318A;

(с) L235E;

(т) F234A и L235A

Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток(после замены) **до замены**.

Другие предпочтительные антигенсвязывающие молекулы представляют собой молекулы антитела, содержащие Fc-область, в котором любая аминокислота в положении 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или 331 (EU-нумерация) среди аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG1-типа, заменена на аминокислоту, которая находится в соответствующем положении согласно EU-нумерации в соответствующем IgG2 или IgG4.

Другие предпочтительные антигенсвязывающие молекулы представляют собой также молекулы антитела, содержащие Fc-область, в котором одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 (EU-нумерация) среди аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG1-типа, заменена(ы) на другие аминокислоты. Изобретение не ограничено типом аминокислоты после замены; однако наиболее предпочтительными являются антигенсвязывающие молекулы антитела, содержащие Fc-область, в котором одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 заменена(ы) на аланин.

Другие предпочтительные антигенсвязывающие молекулы представляют собой также молекулы антитела, содержащие Fc-область, в котором аминокислота в положении 265 (EU-нумерация) среди аминокислот, образующих Fc-область антитела IgG1-типа, заменена другой аминокислотой. Изобретение не ограничено типом аминокислоты после замены; однако наиболее предпочтительными являются

антигенсвязывающие молекулы антитела, содержащие Fc-область, в котором аминокислота в положении 265 заменена на аланин.

Биспецифические антитела к глипикану 3 (GPC3)/комплексу Т-клеточного рецептора

В одном их вариантов осуществления изобретения связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую молекулу, которая содержит:

(1) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3;

(2) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора.

В одном из вариантов осуществления изобретения касательно предлагаемых в настоящем изобретении вариабельных областей L-цепей антитела, содержащихся в вариабельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, и вариабельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, предпочтительно получать общую L-цепь, которая может обеспечивать связывающую активность как с Н-цепью, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, так и с Н-цепью, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и к применению ее в качестве вариабельной области общей L-цепи биспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Примеры предпочтительной вариабельной области Н-цепи антитела, представленной в настоящем описании, которая содержится в вариабельной области антитела со связывающей активностью в отношении глипикана 3, включают вариабельные области Н-цепи антитела, которые представлены в таблице 1, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельных областях Н-цепи антитела, которые указаны в таблице 1, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые функционально эквивалентны вышеуказанным вариабельным областям.

Таблица 1

Обозначение последовательности	SEQ ID NO:	Обозначение последовательности	SEQ ID NO:
H0000	40	GCH042	193
GCH003	170	GCH043	194
GCH005	171	GCH045	195
GCH006	172	GCH053	196
GCH007	173	GCH054	197
GCH008	174	GCH055	198
GCH010	175	GCH056	199
GCH012	176	GCH057	200
GCH013	177	GCH059	201
GCH014	178	GCH060	202
GCH015	179	GCH061	203
GCH016	180	GCH062	204
GCH019	181	GCH064	205
GCH022	182	GCH065	206
GCH023	183	GCH066	207
GCH025	184	GCH067	208
GCH026	185	GCH068	209
GCH027	186	GCH073	210
GCH029	187	GCH094	211
GCH032	188	GCH098	212
GCH034	189	GCH099	213
GCH035	190	GCH100	214
GCH039	191	H0610	215
GCH0	192		

Примеры предпочтительной вариабельной области антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, представленной в настоящем описании, включают вариабельные области антитела, обладающие связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора. Из Т-клеточных рецепторов предпочтительным является CD3, а наиболее предпочтительным CD3ε. Примеры вариабельной области Н-цепи антитела, содержащейся в указанных вариабельных областях антитела, включают вариабельные области Н-цепи антитела, которые представлены в таблице 2, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельных областях Н-цепи, которые указаны в таблице 2, и вариабельные области Н-цепи антитела, которые функционально эквивалентны вышеуказанным вариабельным областям.

Таблица 2

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:
hCE115HA	52
CE115HA177	64
CE115HA178	65
CE115HA179	66
CE115HA180	67
hCE115HAa	68
TR01H006	69
TR01H007	70
TR01H008	71
TR01H009	72
TR01H010	73
TR01H011	74
TR01H012	75
TR01H013	76
TR01H014	77
TR01H015	78
TR01H016	79
TR01H017	80
TR01H018	81
TR01H019	82
TR01H020	83
TR01H021	84
TR01H022	85
TR01H023	86
TR01H024	87
TR01H025	88
TR01H026	89
TR01H027	90
TR01H028	91
TR01H029	92
TR01H030	93
TR01H031	94
TR01H032	95
TR01H033	96
TR01H034	97
TR01H035	98

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:
TR01H036	99
TR01H037	100
TR01H038	101
TR01H039	102
TR01H040	103
TR01H041	104
TR01H042	105
TR01H043	106
TR01H044	107
TR01H045	108
TR01H046	109
TR01H047	110
TR01H048	111
TR01H049	112
TR01H050	113
TR01H051	114
TR01H052	115
TR01H053	116
TR01H054	117
TR01H055	118
TR01H056	119
TR01H057	120
TR01H058	121
TR01H061	122
TR01H062	123
TR01H063	124
TR01H064	125
TR01H065	126
TR01H066	127
TR01H067	128
TR01H068	129
TR01H069	130
TR01H070	131
TR01H071	132
TR01H072	133
TR01H073	134

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:
TR01H074	135
TR01H075	136
TR01H076	137
TR01H077	138
TR01H079	139
TR01H080	140
TR01H081	141
TR01H082	142
TR01H083	143
TR01H084	144
TR01H090	145
TR01H091	146
TR01H092	147
TR01H093	148
TR01H094	149
TR01H095	150
TR01H096	151
TR01H097	152
TR01H098	153
TR01H099	154
TR01H100	155
TR01H101	156
TR01H102	157
TR01H103	158
TR01H104	159
TR01H105	160
TR01H106	161
TR01H107	162
TR01H108	163
TR01H109	164
TR01H110	165
TR01H111	166
TR01H112	167
TR01H113	168
TR01H114	169
TR01H001	420
TR01H002	421
TR01H003	422
TR01H004	423
rCE115H	424
CE115HA121	425
CE115HA122	426
CE115HA124	427
CE115HA192	428
CE115HA236	429
CE115HA251	430
CE115HA252	431

Соотношение между аминокислотными остатками CDR-участков, образующих аминокислотную последовательность H-цепи антитела, и EU-нумерацией Кэбота представлено на фиг. 2.

Примеры вариабельной области общей L-цепи, которую можно применять согласно настоящему изобретению, включают вариабельные области L-цепи, указанные в таблице 3, вариабельные области L-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельных областях L- цепи антитела, указанных в таблице 3, и вариабельные области L-цепи антитела, которые функционально эквивалентны вышеуказанным вариабельным областям.

Таблица 3

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:
L0000	53	L0125	264	L0214	312
L0002	217	L0126	265	L0215	313
L0003	218	L0127	266	L0216	314
L0006	219	L0129	267	L0217	315
L0007	220	L0132	268	L0218	316
L0008	221	L0134	269	L0219	317
L0009	222	L0136	270	L0220	318
L0011	223	L0137	271	L0222	319
L0012	224	L0138	272	L0223	320
L0013	225	L0139	273	L0224	321
L0014	226	L0140	274	L0226	322
L0015	227	L0141	275	L0227	323
L0016	228	L0143	276	L0228	324
L0032	229	L0144	277	L0229	325
L0038	230	L0145	278	L0230	326
L0039	231	L0147	279	L0231	327
L0041	232	L0148	280	L0232	328
L0042	233	L0149	281	L0233	329
L0043	234	L0151	282	L0234	330
L0044	235	L0152	283	L0235	331
L0045	236	L0154	284	L0236	332
L0046	237	L0155	285	L0237	333
L0047	238	L0157	286	L0238	334
L0062	239	L0160	287	L0239	335
L0063	240	L0161	288	L0240	336
L0064	241	L0163	289	L0241	337
L0065	242	L0167	290	L0242	338
L0066	243	L0168	291	L0243	339
L0069	244	L0173	292	L0246	340
L0075	245	L0175	293	L0247	341
L0079	246	L0180	294	L0248	342
L0082	247	L0181	295	L0249	343
L0085	248	L0186	296	L0250	344
L0089	249	L0187	297	L0258	345
L0090	250	L0200	298	L0259	346
L0091	251	L0201	299	L0260	347
L0093	252	L0202	300	L0261	348
L0104	253	L0203	301	L0262	349
L0106	254	L0204	302	L0263	350
L0107	255	L0205	303	L0264	351
L0109	256	L0206	304	L0265	352
L0113	257	L0207	305	L0266	353
L0115	258	L0208	306	L0267	354
L0117	259	L0209	307	L0268	355
L0120	260	L0210	308	L0269	356
L0122	261	L0211	309	L0270	357
L0123	262	L0212	310	L0271	358
L0124	263	L0213	311	L0272	359

Соотношение между аминокислотными остатками CDR-участков, образующих аминокислотную последовательность L-цепи антитела, и EU-нумерацией Кэбота представлено на фиг. 3.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения примеры комбинации вариабельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, и вариабельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, включают комбинации вариабельных областей Н-цепи антитела, которые представлены в таблице 4, комбинации вариабельных областей Н-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариабельных областях Н-цепи антитела, представленные в таблице 4, и комбинации вариабельных областей Н-цепи антитела, функционально эквивалентные указанным вариабельным областям.

Таблица 4

Плечо GPC3/плечо комплекса Т-клеточного рецептора	SEQ ID NO:
H0000/hCE115HA	40/52
H0000/CE115HA251	40/430
H0000/CE115HA236	40/429
H0000/TR01H002	40/421
H0000/CE115HA122	40/426
H0610/rCE115H	215/424
H0610/TR01H040	215/103
H0610/TR01H061	215/122
H0610/TR01H068	215/129
H0610/TR01H071	215/132
GCH054/TR01H067	197/128
GCH094/TR01H082	211/142
GCH094/TR01H084	211/144
GCH065/TR01H084	206/144
GCH065/TR01H082	206/142
GCH094/TR01H109	211/164
GCH065/TR01H109	206/164
GCH094/TR01H113	211/168
GCH065/TR01H113	206/168

Предпочтительная общая L-цепь для указанных выше комбинаций вариабельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, и

вариабельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, включает, например, L0000, L0011, L0201, L0203, L0204, L0206, L0208, L0209, L0211, L0212, L0222 и общие L-цепи, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3которых идентичны аминокислотным последовательностям CDR1, CDR2 и CDR3 указанных общих L-цепей. Конкретные предпочтительные комбинации включают, например, комбинации вариабельных областей Н-цепи антитела и общей L-цепи, которые представлены в таблице 5, комбинации вариабельных областей антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых, идентичны аминокислотным последовательностям CDR1, CDR2 и CDR3, которые входят в вариабельные области общей L-цепи, представленные в таблице 5, и комбинации вариабельных областей Н-цепи антитела и общей L-цепи, функционально эквивалентные указанным вариабельным областям.

Таблица 5

Плечо GPC3/плечо комплекса Т-клеточного рецептора/общая L-цепь	SEQ ID NO:
H0610/rCE115H/L0000	215/424/53
H0610/TR01H040/L0000	215/103/53
H0610/TR01H040/L0201	215/103/299
H0610/TR01H040/L0203	215/103/301
H0610/TR01H040/L0204	215/103/302
H0610/TR01H040/L0206	215/103/304
H0610/TR01H040/L0208	215/103/306
H0610/TR01H040/L0209	215/103/307
H0610/TR01H040/L0211	215/103/309
H0610/TR01H061/L0000	215/122/53
H0610/TR01H068/L0000	215/129/53
H0610/TR01H071/L0000	215/132/53
GCH054/TR01H067/L0201	197/128/299
GCH054/TR01H067/L0212	197/128/310
GCH054/TR01H067/L0222	197/128/319
GCH054/TR01H067/L0000	197/128/53
GCH094/TR01H082/L0201	211/142/299
GCH094/TR01H082/L0011	211/142/223
GCH094/TR01H084/L0011	211/144/223
GCH065/TR01H084/L0011	206/144/223
GCH065/TR01H082/L0011	206/142/223
GCH094/TR01H109/L0011	211/164/223
GCH065/TR01H109/L0011	206/164/223
GCH094/TR01H113/L0011	211/168/223
GCH065/TR01H113/L0011	206/168/223

Не накладываются конкретные ограничения на Fc-область, входящую в связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела (предпочтительно биспецифическое антитело), если она представляет собой Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора, но примеры предпочтительной Fc-области, предлагаемой в настоящем изобретении, включают комбинацию участка Fc-области E22Hh и участка Fc-области E22Hk, комбинацию участка Fc-области E2702GsKsc и участка Fc-области E2704sEpsc и комбинацию участка Fc-области E2702sKsc и участка Fc-области E2704sEpsc.

ERY974

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела, указанная в настоящем описании, представляет собой

ERY974. ERY974 представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора. Указанное биспецифическое антитело содержит TR01H113 (SEQ ID NO: 168) в качестве CD3-плеча вариабельной области тяжелой цепи, E2702sKsc (SEQ ID NO: 62) в качестве CD3-плеча константной области тяжелой цепи, GCH065 (SEQ ID NO: 206) в качестве GPC3-плеча вариабельной области тяжелой цепи, E2704sEpsc (SEQ ID NO: 61) в качестве GPC3-плеча константной области тяжелой цепи, L0011 (SEQ ID NO: 223) в качестве вариабельной области общей легкой цепи и k0 (SEQ ID NO: 63) в качестве константной области общей легкой цепи. В другом варианте антитела ERY974 его CD3-плечо тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402, GPC3-плечо тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 385 и общая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 410 соответственно.

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислоты, содержащиеся в аминокислотных последовательностях, указанных в настоящем описании, можно подвергать пост-трансляционной модификации. Хорошо известная специалистам в данной области модификация представляет собой, например, конверсию путем пироглутамилирования N-концевого остатка глутамина (Q) в пироглутаминовую кислоту (pGlu). Даже, когда аминокислоты пост-трансляционно модифицированы таким образом, они, естественно, включены в аминокислотные последовательности, указанные в настоящем описании.

Другие предпочтительные связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител, указанные в настоящем описании, включают биспецифические антитела, которые содержат вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, и вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении CD3ε. Более предпочтительно его цитотоксическая активность является такой же или превышает активность биспецифического антитела GPC3_ERY22_rCE115 (которое описано в примере 1 в WO 2015/156268). Примеры указанных биспецифических антител включают биспецифическое антитело, содержащее H- и L-цепи, указанные в примере 3 (таблица 13) в WO 2015/156268, или биспецифическое антитело, которое связывается с

эпитопом, перекрывающимся с эпитопом, с которым связывается антитело, и которое содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора.

В контексте настоящего изобретения фраза «функционально эквивалентные» касательно применения в качестве биспецифического антитела означает, что аффинности связывания с антигеном эквивалентны или в альтернативном варианте означает, что цитотоксическая активность в отношении экспрессирующих глипикан 3 клеток или тканей, содержащих указанные клетки, эквивалентна. Аффиность связывания и цитотоксическую активность можно измерять с помощью метода, указанного в настоящем описании. Клетки, применяемые для измерения цитотоксической активности, могут представлять собой требуемые экспрессирующие GPC3 клетки или требуемую ткань, содержащую указанные клетки, и, например, можно применять линии человеческих раковых клеток PC-10 или NCI-H446, которые экспрессируют GPC3. Касательно константных областей антитела фраза может означать что, пониженная связывающая активность в отношении Fcγ-рецептора является эквивалентной.

Например, фраза «вариабельная область H-цепи антитела, функционально эквивалентная вариабельной области H-цепи антитела, указанной в настоящем описании (т.е. исходной вариабельной области H-цепи)», означает, что эта область имеет такую же аффинность связывания при ее объединении с указанной в настоящем описании вариабельной областью L-цепи антитела, которая образует пару с исходной H-цепью, или в альтернативном варианте означает, что область обладает такой же цитотоксической активностью в отношении экспрессирующих глипикан 3 клеток или тканей, содержащих указанные клетки, когда ее применяют для получения биспецифического антитела. Кроме того, фраза «вариабельная область L-цепи антитела, функционально эквивалентная вариабельной области L-цепи антитела, указанной в настоящем описании (т.е. исходной вариабельной области L-цепи)», означает, что эта область имеет такую же аффинность связывания при ее объединении с указанной в настоящем описании вариабельной областью H-цепи антитела, которая образует пару с исходной L-цепью, или в альтернативном варианте означает, что область обладает такой же цитотоксической активностью в отношении экспрессирующих глипикан 3 клеток или тканей, содержащих указанные клетки, когда ее применяют для получения биспецифического антитела.

Понятие «эквивалентный» не обязательно подразумевает наличие такого же уровня активности, и активность может быть повышенной. В частности, антигенсвязывающая аффинность, включает, например, случай, в котором отношение (величина KD/величина KD родительского антитела), полученное при сравнении с аффинностью связывания вариабельной области антитела, которая служит в качестве контроля (величина KD родительского антитела), составляет 1,5 или менее. Отношение величина KD/величина KD родительского антитела предпочтительно составляет 1,3 или менее, более предпочтительно 1,2 или менее, 1,1 или менее, 1,0 или менее, 0,9 или менее, 0,8 или менее, 0,7 или менее, 0,6 или менее, или 0,5 или менее. При этом не существует нижнего предела, примеры включают отношения, составляющие 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} или 10^{-6}. Более конкретно, согласно настоящему изобретению отношение величина KD/величина KD родительского антитела предпочтительно составляет от 10^{-6} до $1,5 \times 10^{-0}$, более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-1}, еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-2} и еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-3}. Касательно цитотоксической активности, примеры включают случай, в котором отношение (скорость ингибирования клеточного роста/скорость ингибирования клеточного роста родительским антителом), полученное при сравнении со скоростью ингибирования роста клетки биспецифическим антителом, которое служит в качестве контроля (скорость ингибирования клеточного роста родительским антителом), составляет 0,7 или более. Концентрацию добавленной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять соответствующим образом, но предпочтительно она составляет, например 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 или 1нМ; и предпочтительно измерения осуществляют при концентрации 0,05 или 0,1нМ. Отношение скорость ингибирования клеточного роста/скорость ингибирования клеточного роста родительским антителом предпочтительно составляет 0,8 или более, более предпочтительно 0,9 или более, 1,0 или более, 1,2 или более, 1,5 или более, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более или 20 или более. При этом не существует верхнего предела, отношение может составлять 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 или 10^6.

Кроме того, касательно цитотоксической активности примеры включают случай, в котором отношение (концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%/концентрация родительского антитела, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%), полученное при сравнении с концентрацией исходного биспецифического антитела, вызывающей ингибирование клеточного роста на 50% (концентрация родительского антитела, вызывающая ингибирование клеточного роста

на 50%), составляет 1,5 или менее. Концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%, означает концентрацию мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы антитела, необходимую для снижения скорости клеточной пролиферации наполовину по сравнению с вариантом, в котором не добавляют мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Отношение «концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%/концентрация родительского антитела, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%» предпочтительно составляет 1,3 или менее, более предпочтительно 1,2 или менее, 1,1 или менее, 1,0 или менее, 0,9 или менее, 0,8 или менее, 0,7 или менее, 0,6 или менее или 0,5 или менее. При этом не существует нижнего предела, примеры включают отношения, составляющие 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} или 10^{-6}. В частности, отношение предпочтительно составляет от 10^{-6} до $1,5 \times 10^{-0}$, более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-1}, еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-2} и еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-3}.

Касательно домена, содержащего вариабельную область антитела, которая обладает GPC3-связывающей активностью, величина KD, характеризующая связывание с GPC3 (например, человеческим GPC3) может составлять, например, 5×10^{-9}M или менее, предпочтительно 4×10^{-9}M или менее, например, 3×10^{-9}M или менее, 2×10^{-9}M или менее, 1×10^{-9}M или менее, 8×10^{-10}M или менее, 5×10^{-10}M или менее, 4×10^{-10}M или менее, 3×10^{-10}M или менее, 2×10^{-10}M или менее, 1×10^{-10}M или менее, 8×10^{-11}M или менее, 5×10^{-11}M или менее, 4×10^{-11}M или менее, 3×10^{-11}M или менее, 2×10^{-11}M или менее, 1×10^{-11}M или менее, 8×10^{-12}M или менее, 5×10^{-12}M или менее, 4×10^{-12}M или менее, 3×10^{-12}M или менее, 2×10^{-12}M или менее, 1×10^{-12}M или менее, 8×10^{-13}M или менее, 5×10^{-13}M или менее, 4×10^{-13}M или менее, 3×10^{-13}M или менее, 2×10^{-13}M или менее или 1×10^{-13}M или менее.

Касательно домена, содержащего вариабельную область, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, величина KD, характеризующая связывание с человеческим комплексом Т-клеточного рецептора, такого как человеческий Т-клеточный рецептор или более конкретно, например, человеческий CD3ε-цепи, может составлять, например, 2×10^{-7}M или менее, предпочтительно $1,5 \times 10^{-7}$M или менее, например, $1,4 \times 10^{-7}$M или менее, $1,3 \times 10^{-7}$M или менее, $1,2 \times 10^{-7}$M или менее, 1×10^{-7}M или менее, 3×10^{-8}M или менее, 2×10^{-8}M или менее, 1×10^{-8}M или менее, 8×10^{-9}M или менее, 5×10^{-9}M или менее, 4×10^{-9}M или менее, 3×10^{-9}M или менее, 2×10^{-9}M или менее, 1×10^{-9}M или менее, 8×10^{-10}M или менее, 5×10^{-10}M или менее, 4×10^{-10}M или менее, 3×10^{-10}M или менее, 2×10^{-10}M

или менее, 1×10^{-10}M или менее, 8×10^{-11}M или менее, 5×10^{-11}M или менее, 4×10^{-11}M или менее, 3×10^{-11}M или менее, 2×10^{-11}M или менее, 1×10^{-11}M или менее, , 8×10^{-12}M или менее, 5×10^{-12}M или менее, 4×10^{-12}M или менее, 3×10^{-12}M или менее, 2×10^{-12}M или менее или 1×10^{-12}M или менее.

Биспецифические антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно имеют величины KD, характеризующие связывание с человеческим GPC3 и человеческим комплексом Т-клеточного рецептора (например, с человеческой CD3ε-цепью), которые составляют 5×10^{-9}M или менее и 2×10^{-7}M или менее соответственно и более предпочтительно 1×10^{-9}M или менее и 5×10^{-8}M или менее соответственно.

В настоящем изобретении вариабельные области антитела, которые являются «функционально эквивалентными», не ограничены конкретными областями, если они представляют собой вариабельные области H-цепи и/или L-цепи антитела, которые удовлетворяют вышеуказанным требованиям. Примеры таких вариабельных областей антитела включают области, полученные путем интродукции замены, делеции, добавления и/или инсерции одной или нескольких аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислот) в аминокислотные последовательности вариабельных областей, которые представлены выше в таблицах 1-3. Хорошо известный специалистам в данной области метод интродукции одной или нескольких аминокислотных замен, делеций, добавлений и/или инсерций в аминокислотную последовательность представляет собой метод интродукции мутаций в белки. Например, специалисты в данной области могут получать вариабельные области, которые являются функциональными эквивалентами вариабельных областей антитела, обладающих указанными выше функциями, путем интродукции соответствующих мутаций в аминокислотные последовательности с использованием таких методов как сайтнаправленный мутагенез (Hashimoto-Gotoh T., Mizuno T., Ogasahara Y. и Nakagawa M., An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 1995, сс. 271-275; Zoller M.J. и Smith M., Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 1983, сс. 468-500; Kramer W. Drutsa V., Jansen H.W., Kramer B., Pflugfelder M. и Fritz H.J., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W. и Fritz, H.J., Oligonucleotide-directed construction of mutations *via* gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 1987, сс. 350-367; и Kunkel T.A., Rapid and efficient site-specific

mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad. Sci. U S A. 82, 1985, cc. 488-492).

Когда аминокислотный остаток изменяют, аминокислоту предпочтительно заменяют в результате мутации на другую(ие) аминокислоту(ы), сохраняющую(ие) характеристики боковых цепей аминокислот. Примерами аминокислот с такими характеристиками боковых цепей являются: гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y и V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S и T), аминокислоты, содержащие алифатические боковые цепи (G, A, V, L, I и P), аминокислоты с содержащими гидроксильную группу боковыми цепями (S, T и Y), аминокислоты с содержащими атом серы боковыми цепями (C и M), аминокислоты с содержащими карбоновую кислоту и амид боковыми цепями (D, N, E и Q), аминокислоты с оснóвными боковыми цепями (R, K и H) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (H, F, Y и W) (в скобках представлены обозначения аминокислот в соответствии с однобуквенным кодом). Аминокислотные замены в пределах каждой из указанных групп обозначают как консервативные замены. Хорошо известно, что полипептид, содержащий модифицированную аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков в указанной аминокислотной последовательности подвергнут делеции, добавлен и/или заменен на другие аминокислоты, может сохранять исходную биологическую активность (Mark D. F. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, cc. 5662-5666; Zoller M. J. и Smith M., Nucleic Acids Res. 10, 1982, cc. 6487-6500; Wang A. и др., Science 224, 1984, cc. 1431-1433; Dalbadie-McFarland G. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 79, 1982, cc. 6409-6413). Вариабельные области, предлагаемые в настоящем изобретении, содержащие указанные аминокислотные модификации, имеют аминокислотные последовательности, которые идентичны по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% аминокислотным последовательностям CDR-последовательностей, FR-последовательностей вариабельной области или последовательностям полных вариабельных областей до модификации. В контексте настоящего описания идентичность последовательностей определяют в виде процента остатков, идентичных остаткам в исходной аминокислотной последовательности вариабельной области H-цепи или вариабельной области L-цепи, определенного после выравнивания последовательностей и интродукции соответствующих брешей для

увеличения до максимума при необходимости идентичности последовательностей. Идентичность аминокислотных последовательностей можно определять с помощью описанного ниже метода.

Кроме того, «функционально эквивалентную вариабельную область антитела» можно получать, например, из нуклеиновых кислот, которые гибридизуются в строгих условиях с нуклеиновыми кислотами, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области, указанной выше в таблицах 1-3. Строгие условия гибридизации, применяемые для выделения нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в строгих условиях с нуклеиновой кислотой, которая содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области, включают, например, следующие условия: 6M мочевина, 0,4% ДСН, 0,5× SSC и 37°C или условия гибридизации эквивалентные по строгости указанным условиям. Выделение нуклеиновых кислот с максимально высокой гомологией можно ожидать при применении более строгих условий, например, следующих условий: 6M мочевина, 0,4% ДСН, 0,1 × SSC и 42°C. Условия промывки после гибридизации представляют собой, например, промывку с использованием 0,5 × SSC (1×SSC представляет собой 0,15M NaCl и 0,015M цитрат натрия, pH 7,0) и 0,1% ДСН при 60°C, более предпочтительно промывку с использованием 0,2× SSC и 0,1% ДСН при 60°C, еще более предпочтительно промывку с использованием 0,2× SSC и 0,1% ДСН при 62°C, еще более предпочтительно промывку с использованием 0,2× SSC и 0,1% ДСН при 65°C и еще более предпочтительно промывку с использованием 0,1× SSC и 0,1% ДСН при 65°C. Последовательности выделенных нуклеиновых кислот можно определять известными методами, которые описаны ниже. Общая гомология нуклеотидной последовательности выделенной нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 50% или выше, предпочтительно 70% или выше и наиболее предпочтительно 90% или выше (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше) при оценке степени идентичности последовательностей.

Нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в строгих условиях с нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность вариабельной области, можно выделять также, применяя вместо описанных выше методов на основе гибридизации, методы амплификации генов, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), в которой используют праймеры, синтезированные на основе информации о нуклеотидной

последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность вариабельной области.

Идентичность одной нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности другой последовательности можно определять с помощью алгоритма BLAST, описанного у Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877). На основе этого алгоритма разработаны программы BLASTN и BLASTX (Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410). Для анализа нуклеотидных последовательностей согласно BLASTN на основе BLAST устанавливают параметры, такие, например, как балл = 100 и длина слова = 12. С другой стороны, параметры, применяемые для анализа аминокислотных последовательностей с помощью BLASTX на основе BLAST, включают, например, балл = 50 и длина слова = 3. Когда используют программы BLAST и Gapped BLAST, то для каждой программы применяют задаваемые по умолчанию параметры. В данной области известны конкретные методики указанных анализов (см. веб-сайт National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Фармацевтические композиции, содержащие связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела

Другим объектом настоящего изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, предпочтительно биспецифическое антитело, которое содержит: (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора. Кроме того, в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, которые индуцируют повреждение клеток, содержащие в качестве действующего вещества связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела. Фармацевтические композиции, указанные в настоящем изобретении, которые индуцируют указанное требуемое повреждение клеток, прежде всего зависимую от Т-клеток клеточную цитотоксичность, предпочтительно вводят индивидууму, который страдает заболеванием, при котором необходимы указанные виды активности для предупреждения или лечения, или индивидууму, у которого возможен рецидив заболевания.

Как уже специально указано выше, человеческий глипикан 3 (GPC3) представляет собой раковый антиген, который специфически экспрессируется в раковых клетках. Поэтому фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, включающую домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, предпочтительно вводят индивидууму, страдающему раком, который может рецидивировать, с целью либо лечения, либо предупреждения, либо с обеими указанными целями. Более конкретно, в настоящем описании представлены фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества биспецифическое антитело которое содержит (1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора; где фармацевтические композиции предназначены для введения вместе с ингибитором VEGF, и предназначены либо для лечения, либо для предупреждения рака, либо для обеих указанных целей; и при этом фармацевтические композиции предназначены для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, связанных с введением фармацевтических композиций.

Кроме того, настоящее описание относится к получению фармацевтических композиций биспецифического антитела, которое содержит (1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора, где композиции вводят в сочетании с ингибитором VEGF, и они предназначены либо для лечения, либо для предупреждения рака, либо для обеих указанных целей, и при этом фармацевтические композиции предназначены для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, связанных с введением фармацевтических композиций.

Альтернативно этому, настоящее описание относится также к способам либо лечения, либо предупреждения рака, либо для обеих указанных целей, путем введения вместе с ингибитором VEGF биспецифического антитела, которое содержит (1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора, где способы предназначены для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, связанных с введением фармацевтических композиций.

Кроме того, в настоящем описании предложено применение биспецифического антитела, вводимого вместе с ингибитором VEGF, которое содержит (1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора, либо для лечения, либо для предупреждения рака, либо для обеих указанных целей, при этом ингибитор VEGF применяют для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, связанных с введением биспецифического антитела.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перед введением фармацевтической композиции можно включать стадию идентификации субъекта, страдающего экспрессирующим GPC3 раком. Методы отбора образцов раковых тканей из живых организмов, идентификации раковых клеток, включенных в отобранные ткани, и определения в них уровней экспрессии GPC3 хорошо известны. При необходимости уровень экспрессии GPC в клетках, применяемых в качестве образца, можно сравнивать с уровнем экспрессии GPC3 в здоровой ткани, и если уровень является более высоким, то уровень экспрессии GPC3 можно оценивать как высокий. Предпочтительными здоровыми тканями для сравнения уровня экспрессии являются здоровые клетки из тех же тканей (органов), что и ткани (органы), из которых получены раковые клетки.

Более конкретно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы либо лечения, либо предупреждения рака, либо и того, и другого, которые включают идентификацию субъекта, страдающего рака с высоким уровнем экспрессии GPC3, и введение идентифицированному субъекту вместе с ингибитором VEGF биспецифического антитела, которое содержит (1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора, где способы предназначены для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, связанных с введением биспецифического антитела.

Кроме того, согласно настоящему описанию индуцирующие цитотоксичность агенты и ингибирующие рост клеток агенты, которые содержат в качестве действующего вещества мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит:

(1) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3,

(2) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и

(3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора,

можно применять в способе индукции повреждения клеток, который включает стадию, на которой вводят индивидууму связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, или можно применять связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела для приготовления индуцирующего цитотоксичность агента и ингибирующего рост клеток агента.

В настоящем описании фраза «содержит в качестве действующего вещества мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит: (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей

активностью в отношении Fcγ-рецептора» означает, что композиция содержит связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела в качестве основного действующего вещества без ограничений, касающихся относительного содержания связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

При необходимости связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител, предпочтительно биспецифические антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно капсулировать в микрокапсулы (микрокапсулы, изготовленные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли(метилметакрилата) и т.п.), и можно включать в компоненты коллоидных систем, предназначенных для введения лекарственных веществ (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) (например, см. «Remington's Pharmaceutical Science 16-ое изд.», под ред. Oslo, 1980)). Кроме того, хорошо известны методы приготовления фармацевтических агентов в виде средств с замедленным высвобождением, и их можно применять для связывающихся с Т-клеточным антигеном молекул антител, предлагаемых в настоящем изобретении (J. Biomed. Mater. Res. 15, 1981, сс. 267-277; Chemtech. 12, 1982, сс. 98-105; US № 3773719; опубликованные европейские патенты (EP) EP 58481 и EP 133988; Biopolymers 22, 1983, сс. 547-556).

Фармацевтические композиции, содержащие связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, указанную в настоящем описании, можно вводить пациенту орально или парентерально, и предпочтительным является парентеральное введение. Указанные примеры методов введения включают введение путем инъекции, введение в нос, транспульмонарное введение и чрескожное введение. Примеры введения путем инъекции включают, например, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию и подкожную инъекцию. Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, или индуцирующий цитотоксичность агент и ингибирующий рост клеток агент можно применять системно или местно, например, посредством введения с помощью инъекции. Метод введения можно выбирать в зависимости от возраста пациента и симптомов. Дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,0001 до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,001 до 100000 мг/пациента. Однако дозы фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, или индуцирующего цитотоксичность агента и ингибирующего рост клеток агента не ограничены указанными дозами.

Фармацевтические композиции, содержащие связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, указанную в настоящем описании, можно приготавливать с помощью общепринятых методов (например, см. Remington's Pharmaceutical Science, последнее изд., изд-во Mark Publishing Company, Easton, U.S.A.), и они могут содержать также фармацевтически приемлемые носители и добавки. Их примерами являются (но не ограничиваясь только ими) поверхностно-активные вещества, эксципиенты, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферы, суспендирующие агенты, придающие изотоничность агенты, связывающие вещества, разрыхлители, замасливатели, повышающие текучесть агенты и корригенты и можно применять другие общепринятые носители. Конкретными примерами носителей являются легкая безводная кремниевая кислота, лактоза, кристаллическая целлюлоза, маннит, крахмал, кармеллоза кальция, кармеллоза натрия, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилацетальдиэтиламиноацетат, поливинилпирролидон, желатин, триглицерид со средней длиной цепи жирной кислоты, полиоксиэтиленированное гидрогенизированное касторовое масло 60, сахароза, карбоксиметилцеллюлоза, кукурузный крахмал, неорганическая соль и т.п.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, предназначенные для применения в комбинированной терапии вместе с ингибитором VEGF, которые содержат связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, например, биспецифическое антитело, или предпочтительно биспецифическое антитело, которое связывается с раковым антигеном и CD3, где фармацевтические композиции предназначены для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, связанных с введением биспецифического антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF можно выбирать, например, из группы, которая состоит из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы. В частности, антитела, которые связываются с VEGF, VEGFR1 или VEGFR2, являются предпочтительными ингибиторами VEGF. В частности, бевацизумаб представляет собой гуманизированное антитело к VEGF; альтернативно этому, рамуцирумаб представляет собой гуманизированное антитело к VEGFR2. Кроме

того, лекарственные средства к молекулярным мишеням, такие как афлиберцепт, который разработан с использованием VEGF в качестве мишени, являются также предпочтительными примерами ингибитора VEGF. Подробности, касающиеся комбинированной терапии, представлены в настоящем описании в разделе «V. Комбинированные терапии».

III. Ингибиторы VEGF

В одном из вариантов осуществления изобретения понятие «ингибитор VEGF» или «антагонист VEGF относится к субстанции, которая обладает способностью ингибировать или инактивировать VEGF или снижать уровень экспрессии или уровень активности VEGF. Ингибитором VEGF является, например, соединение, которое связывается с VEGF и частично или полностью блокирует его активность, уменьшает, предупреждает, замедляет активацию, инактивирует или десенсибилизирует его или приводит к понижающей регуляции или активности или экспрессии, действуя в качестве антагониста. В другом примере ингибитор VEGF представляет собой соединение, которое связывается с рецепторами VEGF или ингибирует связывание VEGF с рецепторами, частично или полностью блокируя активность VEGF, уменьшая, предупреждая, замедляя активацию, инактивируя или десенсибилизируя VEGF, или осуществляя понижающую регуляцию активности. Ингибиторы VEGF включают (но не ограничиваясь только ими) полипептидные ингибиторы, такие как антигенсвязывающие молекулы антитела, антитела, производные антител, фрагменты антител и растворимые рецепторы и их производные; нуклеотидные ингибиторы, такие как siРНК или антисмысловые РНК и их производные; генетически модифицированные формы растворимых факторов, например, формы, обладающие измененной активностью; а также встречающиеся в естественных условиях и синтетические антагонисты растворимых факторов; и низкомолекулярные соединения.

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF, выбранных анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF представляет собой антитело, производное антитела или фрагмент антитела, которое/который связывается с одним или несколькими передающими сигналы факторами, выбранными из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2

антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы или их рецепторов.

Ингибиторы передачи сигналов VEGF

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF представляет собой ингибитор передачи сигналов VEGF, такой как ингибитор VEGF или рецептора VEGF. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор может представлять собой анти-VEGF антигенсвязывающую молекулу, антитело к VEGF (включая химерное, гуманизированное или человеческое антитело к VEGF) или его антигенсвязывающий фрагмент или производное антитела. В другом варианте осуществления изобретения ингибитор может представлять собой связывающуюся с антигеном рецептора VEGF (VEGFR) молекулу антитела, антитело к VEGFR (включая химерное, гуманизированное или человеческое антитело к VEGFR) или его антигенсвязывающий фрагмент или производное антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные ингибиторы могут представлять собой растворимый рецептор VEGF или его фрагмент, который может блокировать передачу сигналов VEGF. В другом варианте осуществления изобретения рецептор VEGF или его фрагмент может представлять собой слитый белок, который слит с гетерологичным доменом, таким как Fc-домен, например, слитый белок VEGFR-Fc..

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к VEGF включает, например, бевацизумаб и ранибизумаб. В другом варианте антитело к рецептору VEGF включает, например, рамуцирумаб. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор передачи сигналов VEGF включает рекомбинантные слитые белки, такие как афлиберцепт.

Бевацизумаб

Бевацизумаб представляет собой гуманизированное антитело к VEGF. Бевацизумаб представляет собой антитело, обозначенное согласно японским общепринятым названиям фармацевтических препаратов (JAN) как бевацизумаб, регистрационный номер CAS 216974-75-3, или имеющее INN-название (международное незапатентованное название) бевацизумаб. Бевацизумаб представляет собой также рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, которое состоит из гипервариабельных участков мышиного моноклонального антитела к человеческому сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF), человеческих каркасных участков и константных областей человеческого IgG1. Бевацизумаб получают в клетках яичника китайского хомячка. Бевацизумаб представляет собой

гликопротеин (молекулярная масса примерно 149000), состоящий из двух H-цепей (γ1-цепи), которые содержат 453 аминокислотных остатка, и двух L-цепей (к-цепи), которые содержат 214 аминокислотных остатков. «Бевацизумаб» включает также биологические аналоги бевацизумаба.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибитор VEGF Другим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, которые содержат в качестве действующего вещества ингибитор VEGF, предпочтительно антитело против VEGF или его рецепторов и более предпочтительно бевацизумаб или рамуцирумаб. С другой стороны, в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества слитый белок, который содержит внеклеточный домен рецептора VEGF или предпочтительно афлиберцепт. Кроме того, в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества ингибитор VEGF, предназначенные для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо одного, либо обоих симптомов, выбранных из синдрома выброса цитокинов (CRS) и высвобождения цитокинов. Фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, предпочтительно вводят индивидууму, у которого может развиться CRS или высвобождение цитокинов, и/или индивидууму, в которого развился CRS или появились признаки CRS и который нуждается в лечении. В конкретных вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, механизм, который приводит (или может приводить) к CRS или высвобождению цитокинов у субъектов, может представлять собой любой механизм. Это означает, что, независимо от причины, ингибитор VEGF можно вводить субъектам, у которых наблюдается CRS или наблюдается высвобождение цитокинов, или ожидается развитие CRS или высвобождение цитокинов. Например, если введение данного фармацевтического агента может приводить к CRS или высвобождению цитокинов, то можно отбирать субъектов, которым вводили (или должны вводить) указанный фармацевтический агент, и им можно вводить ингибитор VEGF. Например, у субъекта, у которого в прошлом наблюдался CRS или высвобождение цитокинов в результате введения данного фармацевтического агента, может развиться CRS или высвобождение цитокинов, если тот же фармацевтический агент вводить повторно.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложена стадия отбора из субъектов, у которых CRS или высвобождение

цитокинов обнаружены в прошлом в результате введения данного фармацевтического агента, субъекта, которому должны вводить или вводили этот же фармацевтический агент, для того, чтобы субъекту вводить ингибитор VEGF вместе с фармацевтическим агентом. Альтернативно этому, согласно настоящему описанию в случае, если субъекту, у которого в прошлом наблюдался CRS или высвобождение цитокинов в результате введения данного фармацевтического агента, предполагается введение этого же фармацевтического агента, то предложено использовать ингибитор VEGF для введения субъекту вместе с фармацевтическим агентом. Кроме того, в настоящем описании предложен способ, включающий отбор из субъектов, у которых CRS или высвобождение цитокинов обнаружено в прошлом в результате введения данного фармацевтического агента, субъекта, которому должны вводить или вводили этот же фармацевтический агент, и введение субъекту ингибитора VEGF вместе с фармацевтическим агентом, который представляет собой способ, предназначенный для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения по меньшей мере одного симптома, выбранного из CRS и высвобождения цитокинов, которые являются результатом введения этого же фармацевтического агента. Согласно настоящему описанию пример лечения, которое может вызвать CRS или высвобождение цитокинов у субъекта, включает введение субъекту связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, такой как биспецифическое антитело или предпочтительно биспецифическое антитело, которое связывается с раковым антигеном и CD3.

Не ограничиваясь нижеследующим, механизм, который позволяет использовать фармацевтическую композицию, содержащую в качестве действующего вещества ингибитор VEGF, представленный в настоящем описании, для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, представляет собой механизм, который может подавлять высвобождение IL-6 путем ингибирования передачи сигналов VEGF. Не ограничиваясь нижеследующим, другой механизм, который позволяет использовать фармацевтическую композицию, содержащую в качестве действующего вещества ингибитор VEGF, представленный в настоящем описании, для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения CRS, представляет собой механизм, при котором ингибитор VEGF подавляет проницаемость сосудов и может подавлять проникновение цитокинов из кровеносных сосудов в ткани.

Таким образом, согласно настоящему описанию фармацевтические композиции, которые содержат в качестве действующего вещества ингибитор VEGF, можно применять также в способе, предназначенном для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, где способ включает введение индивидууму ингибитора VEGF; или можно применять ингибитор VEGF для приготовления фармацевтического средства, предназначенного для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

В настоящем описании фраза «содержит в качестве действующего вещества ингибитор VEGF» означает, что композиция содержит ингибитор VEGF в качестве основного действующего вещества без ограничений, касающихся содержания ингибитора VEGF.

При необходимости ингибиторы VEGF, предлагаемые в настоящем изобретении, можно капсулировать в микрокапсулы (микрокапсулы, изготовленные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли(метилметакрилата) и т.п.), и можно включать в компоненты коллоидных систем, предназначенных для введения лекарственных веществ (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) (например, см. «Remington's Pharmaceutical Science 16-ое изд.», под ред. Oslo, 1980)). Кроме того, хорошо известны методы приготовления фармацевтических агентов в виде средств с замедленным высвобождением, и их можно применять для ингибиторов VEGF, предлагаемых в настоящем изобретении (J. Biomed. Mater. Res. 15, 1981, сс. 267-277; Chemtech. 12, 1982, сс. 98-105; US № 3773719; опубликованные европейские патенты (EP) EP 58481 и EP 133988; Biopolymers 22, 1983, сс. 547-556).

Фармацевтические композиции, содержащие ингибитор VEGF, указанный в настоящем описании, можно вводить пациенту орально или парентерально, и предпочтительным является парентеральное введение. Указанные примеры методов введения включают введение путем инъекции, трансназальное, транспульмонарное введение и чрескожное введение. Примеры введения путем инъекции включают, например, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию и подкожную инъекцию. Фармацевтическую композицию, предлагаемую в

настоящем изобретении, или индуцирующий цитотоксичность агент и ингибирующий рост клеток агент можно применять системно или местно, например, посредством введения с помощью инъекции. Метод введения можно выбирать в зависимости от возраста пациента и симптомов. Дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,0001 до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,001 до 100000 мг/пациента. Однако дозы фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, не ограничены указанными дозами.

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF представляет собой бевацизумаб, действующее вещество вводят примерно в количестве 5-15 мг/кг на дозу, например, на дозу, выбранную из следующих доз: 5 мг/кг или менее, 7,5 мг/кг или менее, 10 мг/кг или менее и 15 мг/кг или менее на дозу, пациенту весом 30 кг или более, например, путем внутривенной инъекции в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч или 3 ч. В одном из вариантов осуществления изобретения, когда ингибитор VEGF представляет собой рамуцирумаб, действующее вещество вводят примерно в количестве 4-12 мг/кг на дозу, например, 8 мг/кг или менее и 10 мг/кг или менее на дозу, пациенту весом 30 кг, например, путем внутривенной инъекции в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч или 3 ч. В различных вариантах осуществления изобретения, когда бевацизумаб или рамуцирумаб вводят с целью лечения CRS, а симптомы CRS не улучшаются после первого введения пациенту бевацизумаба или рамуцирумаба, то введения бевацизумаба или рамуцирумаба можно осуществлять дополнительно вплоть до трех раз. В одном из примеров, когда бевацизумаб или рамуцирумаб вводят последовательно указанным образом интервал после предыдущего введения должен составлять 8 ч или более.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибитор VEGF, указанный в настоящем описании, можно приготавливать с помощью общепринятых методов (например, см. Remington's Pharmaceutical Science, последнее изд., изд-во Mark Publishing Company, Easton, U.S.A.), и они могут содержать также фармацевтически приемлемые носители и добавки. Их примерами являются (но не ограничиваясь только ими) поверхностно-активные вещества, эксципиенты, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферы, суспендирующие агенты, придающие изотоничность агенты, связующие вещества, разрыхлители, замасливатели, повышающие текучесть агенты и корригенты и можно применять другие общепринятые носители. Конкретными примерами носителей являются легкая безводная кремниевая кислота, лактоза, кристаллическая целлюлоза, маннит, крахмал,

кармеллоза кальция, кармеллоза натрия, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилацетальдиэтиламиноацетат, поливинилпирролидон, желатин, триглицерид со средней длиной цепи жирной кислоты, полиоксиэтиленированное гидрогенизированное касторовое масло 60, сахароза, карбоксиметилцеллюлоза, кукурузный крахмал, неорганическая соль и т.п.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие ингибитор VEGF, предпочтительно ингибитор VEGF, более предпочтительно антитело к VEGF или его рецептору и наиболее предпочтительно бевацизумаб или рамуцирумаб, где фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинированной терапии в сочетании со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела. Кроме того, в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества ингибитор VEGF, состоящий из слитого белка, который содержит лигандсвязывающий сайт рецептора VEGF, предпочтительно афлиберцепт, где фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинированной терапии в сочетании со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой, например, биспецифическое антитело, или предпочтительно биспецифическое антитело, которое связывается с раковым антигеном и CD3. Подробности, касающиеся комбинированной терапии, представлены в настоящем описании в разделе «V. Комбинированные терапии».

IV. Синдром выброса цитокинов (CRS)

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения синдром выброса цитокинов (CRS) представляет собой серьезное и потенциально опасное для жизни побочное действие, которое может происходить, когда вводят фармацевтический агент, например, фармацевтическое антитело (такое как антитело к Т-клеткам) или фармацевтическую Т-клетку (такую как Т-клетка, несущая химерный антигенный рецептор (CAR) (CAR-Т-клетка)). Введение антитела в качестве фармацевтического средства или Т-клетки в качестве фармацевтического средства активирует иммунный ответ организма в большей степени, чем это необходимо, и приводят к выбросу воспалительных цитокинов и т.п., что приводит к различным симптомам, таким как озноб, тошнота, недомогание, головная боль, лихорадка, тахикардия и колебания кровяного давления. В частности, серьезные случаи иногда обозначают как

цитокиновый шторм. CRS является результатом высоких уровней активации иммунной системы, когда большие количества лимфоцитов и/или миелоидных клеток при активации высвобождают воспалительные цитокины. Серьезность CRS и время начала симптомов может варьироваться в зависимости от уровня активации иммунных клеток, типа введенного фармацевтического агента и/или количества ткани системной опухоли у индивидуума. В случае Т-клеточной терапии рака начало симптомов, как правило, происходит через несколько дней-недель после применения Т-клеточной терапии, например, в момент, когда имеет место пик Т-клеточной пролиферации *in vivo* (см., например, Lee и др., 124.2, 2014, сс. 188-195).

В одном из вариантов осуществления изобретения симптомы CRS могут включать неврологическую токсичность, диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию, сердечную дисфункцию, респираторный дистресс-синдром взрослых, почечную недостаточность и/или печеночную недостаточность. Например, симптомы CRS могут включать лихорадку/сильную лихорадку с ознобом или без него, усталость, дискомфорт, мышечную боль, рвоту, головную боль, тошноту, потерю аппетита, боль в суставах, диарею, сыпь, гипоксию, тахипноэ, гипотензию, увеличенное пульсовое давление, потенциально уменьшенный сердечный выброс (поздний), увеличенный сердечный выброс (ранний), азотемию, гипофибриногенемию с кровотечением или без него, повышенный уровень D-димера, гипербилирубинемию, трансаминит, спутанное сознание, бред, изменения ментального статуса, галлюцинации, тремор (дрожь), судороги, измененную походку, сложность в подборе слов, выраженную афазию или деменцию.

В одном из вариантов осуществления изобретения CRS отличается повышенной концентрацией нескольких цитокинов у индивидуума. В одном из вариантов осуществления изобретения цитокины включают (но не ограничены ими) IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN-α, IFN-γ, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, TNFα, GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, CXCR-фактор, VEGF, RANTES, эотаксин, EGF, HGF, FGF-β, CD30, CD30L, CD40, CD40L, ферритин и RAGE. Предпочтительно цитокин представляет собой IL-6, IL-1 бета или TNF-альфа или любую их комбинацию. Более предпочтительно цитокин представляет собой IL-6. В одном из вариантов осуществления изобретения пациенты с большими объемами опухолей имеют большую частоту встречаемости и серьезность цитокинового синдрома.

В одном из вариантов осуществления изобретения специалистам в данной области должно быть очевидно, что понятие «концентрация цитокина» включает измеренное значение концентрации, величину кратности изменения, величину процента (%) изменения или величину скорости изменения. Кроме того, в данной области хорошо известны методы измерения цитокинов в крови, слюне, сыворотке, моче, плазме и/или сыворотке.

Серьезность (степень) CRS

В одном из вариантов осуществления изобретения CRS можно классифицировать по серьезности (степени) от 1 до 5. В одном из вариантов осуществления изобретения в случае CRS степени 1 требуется только симптоматическое лечение (например, тошноты, лихорадки, усталости, мышечной боли, недомогания и головной боли) и симптомы не угрожают жизни. В случае CRS степени 2 симптомы требуют умеренного вмешательства и, как правило, дают ответ на умеренное вмешательство. У индивидуумов с CRS степени 2 развивается гипотензия, которая реагирует либо на применение жидкости (инфузионная терапия), либо на применение в низкой дозе одного из типов сосудосуживающего средства; или у них развивается органотоксичность степени 2 или слабые респираторные симптомы, которые реагируют на кислород с более низкой подачей (менее 40% кислорода). У индивидуумов с CRS степени 3 гипотензия, как правило, не поддается реверсии с помощью инфузионной терапии или применения в низкой дозе одного из типов сосудосуживающих средств. Для таких индивидуумов, как правило, требуется применение кислорода с небольшой подачей и у них наблюдается органотоксичность степени 3 (например, почечная или сердечная дисфункция или нарушение свертываемости крови) и/или трансаминит степени 4. Для индивидуумов с CRS степени 3 требуется более агрессивное вмешательство, такое как применение кислорода с подачей 40% или более, применение в высокой дозе сосудосуживающего средства и/или нескольких сосудосуживающих средств. Индивидуумы с CRS степени 4 страдают непосредственно угрожающими жизни симптомами, включая органотоксичность степени 4, или нуждаются в искусственной механической вентиляции. У индивидуумов с CRS степени 4, как правило, отсутствует трансаминит. У индивидуумов с CRS степени 5 токсичность вызывает смерть.

В одном из вариантов осуществления изобретения классификация CRS основана на Общих терминологических критериях нежелательных явлений (CTCAE), версия v4.03, представленных в таблице 6, Общих терминологических критериях

нежелательных явлений (CTCAE), версия v5.0, представленных в таблице 7, критериях Ли (2014 г.) (Lee D.W. и др., Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. Blood, 124, 2014, сс. 188-195), представленных в таблице 8, консенсусной классификации ASTCT CRS 2019 г. (Lee D.W. и др., ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. Biol Blood Marrow Transplant., 25(4), апрель 2019 г., сс. 625-638), представленной в таблице 9, критериях Пенна, критериях MSKCC или критериях CARTOX (Biol Blood Marrow Transplant; 25(4), апрель 2019 г., сс. 625-638, публикация процитирована выше). Предпочтительно классификация CRS основана на критериях CTCAE, версия v4.03, CTCAE, версия v5.0 или критериях Ли (2014 г.). Если специально не указано иное, указанный в настоящем описании CRS относится к CRS, соответствующему критериям, представленным в таблице 8 (критерии Ли, 2014 г).

Таблица 6

CTCAE v 4.03

Степень I	Слабая реакция; не требуется вмешательство с применением инфузии; не требуется лечение
Степень II	Требуется вмешательство с применением лечения или инфузии. Однако имеет место быстрый ответ на симптоматическое лечение (например, на антигистамины, НСПВС, наркотические фармацевтические средства и внутривенную инфузию); требуется профилактическое медикаментозное лечение в течение 24 ч или менее
Степень III	Пролонгированная стадия (например, замедленный ответ на симптоматическое лечение и/или кратковременное вмешательство с применением инфузии); рецидив после начального улучшения; требуется госпитализация вследствие осложнения(й) (например, из-за почечной дисфункции и легочной инфильтрации)
Степень IV	Угрожающая жизни; требуется применение искусственного дыхания под давлением или механической вентиляции
Степень V	Смерть

Таблица 7

(CTCAE v 5.0)

Степень I	Лихорадка, сопровождающаяся или не сопровождающийся системными симптомами
Степень II	Гипотензия, требующая применения инфузии; гипоксия, реагирующая на введение кислорода с небольшой подачей (<40%)
Степень III	Гипотензия, поддающаяся контролю с применением одного сосудосуживающего средства; гипоксия, требующая введения кислорода с подачей ≥40%
Степень IV	Угрожающая жизни; требуется экстренное лечение
Степень V	Смерть

Таблица 8

(Критерии Ли)

Степень I	Не угрожающая жизни; требуется только симптоматическое лечение (лихорадка, тошнота, усталость, головная боль, мышечная боль, дискомфорт)
Степень II	Требуется умеренное вмешательство; гипоксия, реагирующая на введение кислорода с подачей >40%; гипотензия, реагирующая на внутривенную инфузию или введение в низкой дозе одного сосудосуживающего средства; органотоксичность степени 2 или выше

Степень III	Требуется агрессивное вмешательство; гипоксия, реагирующая на введение кислорода с подачей ≤40%; гипотензия, реагирующая на введение в высокой дозе одного или нескольких сосудосуживающих средств; органотоксичность степени 3 или выше или трансаминит степени 4 или выше
Степень IV	Угрожающая жизни; требуется искусственная механическая вентиляция; органотоксичность степени 4 или выше (за исключением трансаминита)
Степень V	Смерть

Таблица 9

(Консенсусная классификация ASTCT CRS)

	Лихорадка		Гипотензия или/или гипоксия
Степень I	38°C или выше	и	Гипотензия: отсутствует, гипоксия: отсутствует
Степень II	38°C или выше	и	Гипотензия, не требующая применения сосудосуживающего средства и/или гипоксия, требующая применения назальной канюли для низкоскоростных потоков или вдува
Степень II	38°C или выше	и	Гипотензия, требующая применения одного сосудосуживающего средства (независимо от сопутствующего применения вазопрессина), и/или гипоксия, требующая применения назальной канюли для высокоскоростных потоков, маски для лица, недыхательной маски или маски Вентури
Степень IV	38°C или выше	и	Гипотензия, требующая применения нескольких сосудосуживающих средств (за исключением вазопрессина) и/или гипоксия, требующая применения избыточного давления (например, CPAP (аппарат для создания постоянного избыточного давления в дыхательных путях), biPAP (аппарат для создания двухуровневого избыточного давления в дыхательных путях), интубации и механической искусственной вентиляции)

В одном из вариантов осуществления изобретения симптомы CRS развиваются в течение нескольких минут, часов или дней после начала введения фармацевтического агента, но некоторые симптомы проявляются с запаздыванием. Предпочтительно симптомы CRS развиваются в течение примерно 96 ч, примерно 72 ч или примерно 48 ч после начала введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, и более предпочтительно симптомы развиваются на следующий день после дня введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В другом варианте осуществления изобретения серьезность симптомов CRS коррелирует с пиком концентраций цитокинов.

Признаки CRS

В одном из вариантов осуществления изобретения признаки CRS соответствуют CRS-подобным симптомам, которые являются предшественниками указанного выше CRS (независимо от степени). Конкретные примеры включают (но не ограничиваясь только ими) лихорадку или гипотензию, которая начинает развиваться после введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

Лечение CRS

В одном из вариантов осуществления изобретения примеры методов лечения CRS включают применение ингибиторов воспалительных VEGF, , базедоксифена, SGP130-блокаторов, вазоактивных фармацевтических агентов, системных гормонов надпочечников (например, кортикостероидов), иммунодепрессантов и механической искусственной вентиляции.

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF представляет собой один или несколько ингибиторов VEGF или антагонистических ингибиторов, выбранных из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы. Предпочтительные ингибиторы VEGF указаны в настоящем описании в разделе «III. Ингибиторы VEGF».

В одном из вариантов осуществления изобретения, когда ингибитор VEGF представляет собой бевацизумаб, действующее вещество вводят примерно в количестве 5-15 мг/кг на дозу, например, на дозу, выбранную из следующих доз: 5 мг/кг или менее, 7,5 мг/кг или менее, 10 мг/кг или менее и 15 мг/кг или менее на дозу, пациенту весом 30 кг или более, например, путем внутривенной инъекции в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч или 3 ч. В одном из вариантов осуществления изобретения, когда ингибитор VEGF представляет собой рамуцирумаб, действующее вещество вводят примерно в количестве 4-12 мг/кг на дозу, например, 8 мг/кг или менее и 10 мг/кг или менее на дозу, пациенту весом 30 кг, например, путем внутривенной инъекции в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч или 3 ч. В различных вариантах осуществления изобретения, когда бевацизумаб (авастин) или рамуцирумаб (луцентис) вводят с целью лечения CRS, а симптомы CRS не улучшаются после первого введения, то введения бевацизумаба (авастина) или рамуцирумаба (луцентиса) можно осуществлять дополнительно вплоть до трех раз. В одном из примеров, когда бевацизумаб (авастин) или рамуцирумаб (луцентис) вводят последовательно указанным образом интервал после предыдущего введения должен составлять 8 ч или более.

Примеры вазоактивных фармацевтических агентов включают (но не ограничиваясь только ими) ангиотензин-11, эндотелин-1, агонисты альфа-адренергических рецепторов, ростаноиды, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты эндотелина, циркуляторные агонисты (например, адреналин, добутамин, изопреналин и эфедрин), сосудосуживающие средства (например, норадреналин, вазопрессин,

метараминол, вазопрессин и метиленовый синий), кардиотонические средства (например, милринон и левосимендан) и допамин.

Примеры сосудосуживающих средств включают (но не ограничиваясь только ими) норэпинефрин, допамин, фенилэфрин, эпинефрин и вазопрессин. В одном из вариантов осуществления изобретения сосудосуживающие средства включают применяемые в высокой дозе сосудосуживающие средства и применяемые в низкой дозе сосудосуживающие средства. В одном из вариантов осуществления изобретения применяемое в высокой дозе сосудосуживающее средство включает одно или несколько из следующих средств: монотерапия норэпинефрином в дозе 20 мкг/мин или более, монотерапия допамином в дозе 10 мкг/кг/мн или более, монотерапия фенилэфрином в дозе 200 мкг/мин или более и/или монотерапия эпинефрином в дозе 10 мкг/мин или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если индивидуума лечат вазопрессином, то применяемое в высокой дозе сосудосуживающее средство включает вазопрессин + норэпинефриновый эквивалент, составляющий 10 мкг/мин или более (где доза норэпинефринового эквивалента = [норэпинефрин (мкг/мин)] + [допамин (мкг/кг/мин)/2] + [эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин)/10]). В некоторых вариантах осуществления изобретения, если индивидуума лечат комбинацией сосудосуживающих средств (которая не включает вазопрессин), то применяемое в высокой дозе сосудосуживающее средство включает норэпинефриновый эквивалент, составляющий 20 мкг/мин или более (где доза норэпинефринового эквивалента = [норэпинефрин (мкг/мин)] + [допамин (мкг/кг/мин)/2] + [эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин)/10] (см., например, *idem*).

В одном из вариантов осуществления изобретения применяемое в низкой дозе сосудосуживающее средство представляет собой сосудосуживающее средство, которое вводят в дозе, более низкой, чем одна или несколько указанных выше доз для применяемых в высокой дозе сосудосуживающих средств.

Примеры кортикостероидов включают (но не ограничиваясь только ими) дексаметазон, гидрокортизон и метилпреднизолон. В одном из вариантов осуществления изобретения дексаметазон в дозе 0,5 мг/кг применяют путем орального или внутривенного введения. В одном из вариантов осуществления изобретения дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное применяют путем орального или внутривенного введения в количестве от 8 до 20 мг на дозу. Как должно быть очевидно специалистам в данной области, доза дексаметазона не

ограничена перечисленными выше и ее можно изменять соответственно в зависимости от состояния индивидуума и серьезности CRS.

Пример иммунодепрессанта включает ингибитор TNF-альфа или ингибитор IL-1. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибиторы TNF-альфа включают антитела к TNF-альфа, например, моноклональное антитело, такое как инфликсимаб. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибиторы TNF-альфа включают растворимые рецепторы TNF-альфа (например, этанерцепт). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибиторы IL-1 или IL-1R включают анакинра (Anakinra).

V. Комбинированные терапии

Один из вариантов осуществления изобретения, представленный в настоящем описании, относится к совместному применению произвольного фармацевтического агента и ингибитора VEGF, где фармацевтический агент представляет собой фармацевтический агент, который вызывает у субъекта при его введении либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, и где совместное применение предназначено для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого в результате введения фармацевтического агента. Комбинированную терапию, представленную в настоящем описании, можно характеризовать также следующим образом:

в частности, комбинированная терапия, включающая применение фармацевтического агента А и фармацевтического агента Б, где фармацевтический агент А обладает способностью потенциально индуцировать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое после введению субъекту, а фармацевтический агент Б представляет собой ингибитор VEGF, и где комбинированная терапия предназначена для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, индуцированных введением фармацевтического агента А.

Другой вариант осуществления изобретения, представленный в настоящем описании, относится к фармацевтической композиции, которая содержит произвольный фармацевтический агент (фармацевтический агент А) и которая предназначена для применения в комбинированной терапии вместе с ингибитором VEGF (фармацевтический агент Б), где фармацевтический агент может индуцировать у субъекта после введения либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и

другое, и где фармацевтическая композиция предназначена для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого в результате введения фармацевтического агента. Следующий вариант осуществления настоящего изобретения, представленный в настоящем описании, относится к фармацевтической композиции, которая содержит ингибитор VEGF и которая предназначена для применения в комбинированной терапии вместе с произвольным фармацевтическим агентом, где фармацевтический агент может индуцировать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое у субъекта после введения, и фармацевтическая композиция предназначена для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого в результате введения фармацевтического агента. В настоящем описании, когда фармацевтический агент, который может индуцировать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, представляет собой связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, то настоящее описание относится к способу лечения рака путем введения ингибитора VEGF, где способ отличается тем, что предназначен для любой одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого в результате введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

В настоящем описании фармацевтический агент, который может индуцировать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, у субъекта после введения, обозначает фармацевтический агент, который может вызывать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое. В частности, примеры включают фармацевтические агенты, для которых описана способность индуцировать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое в качестве побочного действия, сопровождающего введение. Например, фармацевтические агенты, мишенью которых являются лимфоциты, представляют собой фармацевтические агенты, стимулы которых могут индуцировать производство цитокинов. Иными словами, стимулирующие лимфоциты фармацевтические агенты могут становиться причиной либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого. Примерами таких фармацевтических агентов являются фармацевтические агенты, которые содержат в качестве действующего вещества связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения введение ингибитора VEGF преследует любую одну или комбинацию целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, у индивидуума. Таким образом, настоящее описание можно переформулировать, как способ, предназначенный для одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, который включает введение ингибитора VEGF.

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF вводят индивидууму подкожно или внутривенно до, одновременно или после введения произвольного фармацевтического агента, который может вызывать либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и то, и другое. Предпочтительно ингибитор VEGF вводят индивидууму внутривенно до, одновременно или после введения фармацевтического агента. Хотя это не следует рассматривать как ограничение, когда ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением фармацевтического агента, то его действие состоит в предупреждении или уменьшении развития либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, ассоциированных с введением фармацевтического агента. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения произвольного фармацевтического агента, который вызывает либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, или в тот же день, но до введения фармацевтического агента. Альтернативно этому, ингибитор VEGF можно вводить в тот же день и одновременно с введением фармацевтического агента (в настоящем описании введение ингибитора VEGF до введения произвольного фармацевтического агента, который может вызывать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, и введение ингибитора VEGF одновременно с введением фармацевтического агента обозначают в целом, как «предварительное введение ингибитора VEGF). В одном из вариантов осуществления изобретения предварительно введенный ингибитор VEGF предупреждает или ослабляет развитие CRS, ассоциированное с введением произвольного фармацевтического агента, который может вызывать либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, не оказывая существенного влияния на лекарственную эффективность фармацевтического агента (например, на зависимую от Т-клеток клеточную цитотоксичность (TDCC) и противоопухолевое действие).

Кроме того, когда ингибитор вводят после введения произвольного фармацевтического агента, который вызывает либо CRS, либо высвобождение

цитокинов, либо и то, и другое, но до развития CRS, то он оказывает действие, включающее предупреждение или ослабление CRS, который может развиться после этого. Кроме того, когда ингибитор VEGF вводят после введения фармацевтического агента и после развития CRS или признаков CRS, то он оказывает действие, заключающееся в лечении CRS и ослаблении его симптомов.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ либо лечения CRS, либо ослабления его симптомов, либо и того, и другого, который включает мониторинг развития CRS после любого лечения, которое вызывает либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, отбор субъекта, имеющего указанные признаки, и введение субъекту ингибитора VEGF. Методы мониторинга развития CRS и обнаружения признаков CRS являются известными и описаны ранее.

Воздействия ингибитора VEGF, направленные на одну или комбинацию целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, представляют собой воздействия, описанные впервые в настоящем изобретении. Таким образом, в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие ингибитор VEGF, предназначенный для одной или комбинацию целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого. Альтернативно этому, в настоящем описании предложено применение ингибитора VEGF для приготовления фармацевтической композиции, предназначенной для одной или комбинацию целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого. Кроме того, в настоящем описании предложено применение ингибитора VEGF, предназначенного для одной или комбинацию целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого. В настоящем описании предложен способ, предназначенной для одной или комбинацию целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, где способ включает отбор любого субъекта из тех субъектов, у которых развились либо CRS, либо высвобождение цитокинов, либо и то, и другое, субъектов, у которых обнаружены признаки их развития, и субъектов, которые должны подвергаться лечению, которое может приводить либо к CRS, либо к высвобождению цитокинов, либо и к тому, и другому, и введение субъекту ингибитора VEGF. Согласно настоящему описанию лечение, которое может приводить либо к CRS, либо

высвобождение цитокинов, либо и к тому, и другому, представляет собой, например, введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит «домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора» и «домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении ракового антигена», и предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело. В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело может иметь структуру одноцепочечного антитела, например, структуру, в которой вариабельные области антитела сцеплены с помощью линкеров. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела содержит также Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора. Предпочтительно связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора».

В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF, применяемый в комбинированной терапии, представляет собой ингибитор VEGF, предпочтительно антитело против VEGF или его рецептора и наиболее предпочтительно бевацизумаб или рамуцирумаб. В других вариантах осуществления изобретения ингибитор VEGF, применяемый в комбинированной терапии, представляет собой слитый белок, содержащий лигандсвязывающий сайт рецептора VEGF, и его предпочтительные примеры включают афлиберцепт. В одном из вариантов осуществления изобретения, когда бевацизумаб или рамуцирумаб вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, то бевацизумаб или рамуцирумаб вводят взрослым людям и детям, например, в дозе, выбранной из следующих доз: от 5 мг/кг до 100 мг/кг, например, от 5 мг/кг до 90 мг/кг, от 5 мг/кг до 80 мг/кг, от 5 мг/кг до 70 мг/кг, от 5 мг/кг до 60 мг/кг, от 5 мг/кг до 50 мг/кг, от 5 мг/кг до 40 мг/кг, от 5 мг/кг до 30 мг/кг, от 5 мг/кг до 20 мг/кг, от 5 мг/кг

до 15 мг/кг и, например, от 10 мг/кг до 100 мг/кг, от 20 мг/кг до 100 мг/кг, от 30 мг/кг до 100 мг/кг, от 40 мг/кг до 100 мг/кг, от 50 мг/кг до 100 мг/кг, от 60 мг/кг до 100 мг/кг, от 70 мг/кг до 100 мг/кг, от 80 мг/кг до 100 мг/кг, от 90 мг/кг до 100 мг/кг и т.п. на дозу. Кроме того, хотя это указано только для того, чтобы избежать сомнений, например, при указании дозы от 5 мг до 100 мг/кг, подразумевается, что любая доза от 5 мг до 100 мг/кг, изменяющаяся на 0,1 мг/кг, такая как 5,0 мг/кг, 5,1 мг/кг, 5,2 мг/кг, 5,3 мг/кг, 5,4 мг/кг, 49,9 мг, 50 мг/кг, 50,1 мг/кг, 50,2 мг/кг ... 99,8 мг/кг, 99,9 мг/кг и 100 мг/кг индивидуально и конкретно указана в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретения бевацизумаб вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в количестве 15 мг/кг или менее, от 0,5 до 15 мг/кг, от 1 до 15 мг/кг, от 2 до 15 мг/кг, от 3 до 15 мг/кг или от 4 до15 мг/кг на дозу пациенту весом 30 кг или более. В одном из вариантов осуществления рамуцирумаб вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в количестве в количестве 10 мг/кг или менее, от 0,5 до 10 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг, от 2 до 10 мг/кг, от 3 до 10 мг/кг или от 4 до 10 мг/кг на дозу пациенту весом 30 кг или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, помимо совместного применения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF в комбинации можно дополнительно использовать ингибитор иммунных контрольных точек. Понятие «иммунная контрольная точка» относится к сигнальной молекуле, которая экспрессируется на иммунокомпетентных клетках (включая Т-клетки) и ингибирует иммунный ответ против иммунокомпетентных клеток путем связывания с лигандом. Иммунная контрольная точка и ее лиганд включают (но не ограничиваясь только ими) такие молекулы как PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, PD-L1, PD-L2, BTNL2, B7-H3, B7-H4, CD48, CD80, 2B4, BTLA, CD160, CD60, CD86 и VISTA. В некоторых вариантах осуществления изобретения понятие «ингибитор иммунных контрольных точек» согласно настоящему изобретению относится к фармацевтическому агенту, который ингибирует трансдукцию сигнала, опосредуемого иммунной контрольной точкой, путем ингибирования связывания между иммунной контрольной точкой и ее лигандом.

В не ограничивающих объем изобретения вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предпочтительные примеры ингибитора иммунных контрольных точек включают (но не ограничиваясь только ими) антитела к PD1, антитела к PDL1, антитела к CTLA-4, антитела к TIM3 и антитела к LAG3.

Примеры антитела к PD-1 включают пембролизумаб (регистрационный номер CAS 1374853-91-4), ниволумаб (регистрационный номер CAS 946414-94-4), MEDI0680, PDR001, BGB-A317, REGN2810, SHR-1210, PF-06801591 и различные известные антитела к PD1. Примеры антитела к PD-L1 включают атезолизумаб (регистрационный номер CAS 1380723-44-3), авелумаб (регистрационный номер CAS 1537032-82-8), дурвалумаб (регистрационный номер CAS 1428935-60-7), MDX-1105 и различные известные антитела к PD-L1. Примеры антитела к CTLA-4 включают ипилимумаб (регистрационный номер CAS 477202-00-9), тремелимумаб (регистрационный номер CAS R 745013-59-6) и различные известные антитела к CTLA-4. Примеры антитела к TIM3 включают MBG452 и различные известные антитела к TIM3. Примеры антитела к LAG3 включают BMS-986016, LAG525 и различные известные антитела к LAG3.

В конкретном варианте осуществления изобретения, представленном в настоящем описании, когда совместное применение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF дополнительно объединяют с применением ингибитора иммунных контрольных точек, то ингибитор иммунных контрольных точек можно вводить субъекту в любе время. В частности, ингибитор иммунных контрольных точек можно вводить, например, до или после совместного введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF. Так, например, после установления приводящего к регрессу рака действия, вызванного либо совместным применением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела и ингибитора VEGF, либо ингибитора иммунных контрольных точек, можно дополнительно вводить другой неоцененный компонент. В альтернативном варианте указанные три агента можно вводить одновременно.

Комбинированные терапии, указанные в настоящем описании, могут включать также введение кортикостероидов. В одном из вариантов осуществления изобретения для предупреждения или ослабления CRS, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, кортикостероиды вводят индивидууму орально или внутривенно до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, за 2 дня, 1 день или 0 дней (в тот же день) до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела Альтернативно этому, кортикостероид вводят индивидууму орально или внутривенно одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела (что можно обозначать как «предварительное введение кортикостероида» или «предварительное введении стероида»). Предпочтительно предварительное введение кортикостероида

осуществляют в дополнение к предварительному введению ингибитора VEGF (в сочетании с предварительным введением ингибитора VEGF). Примеры предпочтительных кортикостероидов включают (но не ограничиваясь только ими) дексаметазон, гидрокортизон и метилпреднизолон. Предпочтительно кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное, которые вводят орально или внутривенно. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что доза дексаметазона не ограничена указанной выше дозой и ее можно изменять соответственно в зависимости от состояния индивидуума, развития CRS и т.п.

В одном из вариантов осуществления изобретения комбинированную терапию осуществляют в один день с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в следующем порядке: (1) предварительное введение кортикостероида, (2) предварительное введение ингибитора VEGF и (3) введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В этом случае, например, введение кортикостероида индивидууму завершается за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения ингибитора VEGF; кроме того, введение индивидууму ингибитора VEGF завершается за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В другом варианте осуществления изобретения введение осуществляют в один день с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в следующем порядке: (1) предварительное введение ингибитора VEGF, (2) предварительное введение кортикостероида и (3) введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В этом случае, например, введение индивидууму ингибитора VEGF завершается за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения кортикостероида; кроме того, введение индивидууму кортикостероида завершается за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

В другом варианте осуществления изобретения комбинированная терапия, указанная в настоящем описании, не включает предварительное введение кортикостероидов. Предварительное введение ингибитора VEGF предупреждает или

ослабляет развитие CRS, ассоциированное с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела (но не ограничиваясь только указанным), и введение кортикостероидов с целью предупреждения или ослабления CRS становится ненужным.

Комбинированные терапии, предлагаемые в настоящем описании, могут включать также введение тоцилизумаба. В одном из вариантов осуществления изобретения с целью предупреждения или ослабления CRS, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела тоцилизумаб вводят внутривенного индивидууму до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, за 2 дня, 1 день или 0 дней (или в тот же день) до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. Альтернативно этому, тоцилизумаб вводят индивидууму внутривенно вместе с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела (это можно обозначать как «предварительное введение тоцилизумаба» или «предварительная обработка тоцилизумабом»). Предпочтительно предварительное введение тоцилизумаба осуществляют в дополнение к предварительному введению ингибитора VEGF (в сочетании с предварительным введением ингибитора VEGF). Специалистам в данной области должно быть очевидно, что доза тоцилизумаба не ограничена указанной выше дозой, и ее можно соответствующим образом изменять в зависимости от состояния индивидуума, развития CRS и т.п.

В одном из вариантов осуществления изобретения комбинированную терапию осуществляют в тот же день, что и введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в следующем порядке: (1) предварительное введение тоцилизумаба, (2) предварительное введение ингибитора VEGF и (3) введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В этом случае, например, введение индивидууму тоцилизумаба завершают за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения ингибитора VEGF; кроме того, введение индивидууму ингибитора VEGF завершают за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В другом варианте осуществления изобретения введение осуществляют в тот же день, что и введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в следующем порядке: (1) предварительное введение ингибитора VEGF, (2) предварительное введение тоцилизумаба и (3) введение

связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В этом случае, например, введение индивидууму ингибитора VEGF завершают за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения тоцилизумаба; кроме того, введение индивидууму тоцилизумаба завершают за 1 ч или более, 2 ч или более, 3 ч или более, 4 ч или более или 5 ч или более, или предпочтительно за 2 ч или более до начала введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела.

В другом варианте осуществления изобретения комбинированная терапия, указанная в настоящем описании, не включает предварительное введение тоцилизумаба. Хотя это не следует рассматривать как ограничение, если предварительное введение ингибитора VEGF предупреждает или ослабляет развитие CRS, ассоциированное с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, то введение тоцилизумаба с целью предупреждения или ослабления CRS становится ненужным.

Специалистам в данной области, естественно, должно быть очевидно, что связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител, ингибиторы VEGF и/или другие фармацевтические агенты, указанные в настоящем описании, все могут иметь «допустимый диапазон» синхронности введения, интервала дозирования и дозы соответственно, и специалисты в данной области могут определять соответственно допустимый диапазон. Например, своевременное осуществление увеличения или уменьшения интервала дозирования или соответствующее увеличение или уменьшение дозы связывающихся с Т-клеточным антигеном молекул антител, ингибиторов VEGF и/или других фармацевтических агентов с учетом предписания врача, основанного на симптомах у индивидуума и т.п., находится в указанном выше «допустимом диапазоне»

Ниже описаны не ограничивающие объем изобретения конкретные примеры комбинированных терапий, включающих связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител и ингибиторы VEGF.

Введение связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела в сочетании с предварительным введением ингибитора VEGF

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, которая предназначена для применения в комбинированной терапии с ингибитором VEGF. Согласно другому варианту

осуществления изобретения в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор VEGF, которая предназначена для применения со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела. Согласно следующему варианту осуществления изобретения ингибитор VEGF вводят индивидууму до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. Хотя это не следует рассматривать как ограничение, когда ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, то его действие состоит в предупреждении или ослаблении развития CRS, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, или в тот же день, но до введения биспецифического антитела. Альтернативно этому, ингибитор VEGF вводят одновременно со связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулой антитела в тот же день, в который вводят связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения предварительное введение ингибитора VEGF предупреждает или ослабляет развитие CRS, ассоциированного с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, без существенного воздействия на эффективность связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела (например, на зависимую от Т-клеток клеточную цитотоксичность (TDCC) и противоопухолевое действие).

VI. Комбинированные терапии на основе биспецифического антитела к глипикану 3 (GPC3)/комплексу Т-клеточного рецептора и ингибитора VEGF

В одном из вариантов осуществления изобретения в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора, где фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинированной терапии с ингибитором VEGF. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор VEGF, где фармацевтическая композиция предназначена для применения в комбинированной терапии с биспецифическим антителом к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF вводят индивидууму доили одновременно с введением биспецифического антитела к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора.

Хотя это не следует рассматривать как ограничение, но когда ингибитор VEGF вводят до или одновременно с введением связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела, то действие ингибитора состоит в предупреждении или ослаблении развития CRS, ассоциированного с введением биспецифического антитела к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора. В одном из вариантов осуществления изобретения ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения биспецифического антитела к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора, или в тот же день, но до введения биспецифического антитела. Альтернативно этому, ингибитор VEGF вводят в тот же день, что и биспецифическое антитело к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора, и одновременно с биспецифическим антителом (предварительное введение ингибитора VEGF). Конкретные примеры комбинированной терапии, включающей предварительное введение ингибитора VEGF, представлены в различных вариантах осуществления изобретения, описанных выше. В одном из вариантов осуществления изобретения предварительное введение ингибитора VEGF предупреждает или ослабляет развитие CRS, ассоциированного с введением биспецифического антитела к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора без существенного воздействия на лекарственную эффективность биспецифического антитела к GPC3/комплексу Т-клеточного рецептора (например, на зависимую от Т-клеток клеточную цитотоксичность (TDCC) и противоопухолевое действие).

VII. Способы получения и наборы

В настоящем изобретении предложен также набор, предназначенный для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении, который содержит связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, предлагаемую в настоящем изобретении, или связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, созданную способом получения, предлагаемым в настоящем изобретении. Кроме того, в наборе может находиться упаковка с фармацевтически приемлемым носителем, средой, инструкциями, содержащими описание способа применения и т.п.

Настоящее изобретение относится также к связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, или к связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, созданной способом получения, предложенным в настоящем изобретении, для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении.

В настоящем изобретении предложен также набор, содержащий ингибитор VEGF, который предназначен для применения в способе, предлагаемом в настоящем

изобретении. Кроме того, в наборе может находиться упаковка с фармацевтически приемлемым носителем, средой и инструкциями, содержащими описание способа применения и т.п.

Настоящее изобретение относится также к ингибитору VEGF, предназначенному для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, которые кодируют указанные молекулы, векторам, в которые интродуцированы нуклеиновые кислоты, клеткам, содержащим нуклеиновые кислоты или векторы, способам получения молекул путем культивирования клеток и к связывающимся с Т-клеточным антигеном молекулам антитела и ингибиторам VEGF, полученным указанными способами.

Например, связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела можно получать путем интродукции в приемлемую клетку-хозяина нуклеиновой кислоты, которая кодирует связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, или вектора, в который нуклеиновая кислота интродуцирована, и культивирования клетки-хозяина. Когда связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела секретируется, то представляющую интерес связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела можно выделять из супернатанта культуры. Известен также метод очистки из культуры представляющей интерес связывающейся с Т-клеточным антигеном молекулы антитела. С другой стороны, если ингибитор VEGF представляет собой белковый компонент, такой как антитело, то его можно получать таким же образом, что и мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, путем интродукции в приемлемую клетку-хозяина нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ингибитора VEGF, или вектора, в который интродуцирована нуклеиновая кислота, и культивирования клетки-хозяина.

Согласно настоящему описанию связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела и ингибитор VEGF можно упаковывать независимо с фармацевтически приемлемым носителем, средой и инструкциями, содержащими описание способа применения и т.п. Альтернативно этому, их обоих можно включать в препаративные формы, а затем объединять в форме набора. В частности, набор может включать, например, упаковку, содержащую препаативную форму, которая включает связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, и упаковку, содержащую препаративную форму, которая включает ингибитор VEGF. Когда каждая из препативных форм, входящих в набор, является лиофилизированной или

концентрированной жидкой препаративной формой, то в набор может быть включена жидкая среда для растворения или разбавления препаративной формы.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, описанную выше, которая представляет собой фармацевтическую композицию, предназначенную для введения вместе с ингибитором VEGF либо для лечения, либо для предупреждения рака, либо для и того, и другого, и которая предназначена для одной или комбинации целей, выбранных из предупреждения, ослабления и лечения либо CRS, либо высвобождения цитокинов, либо и того, и другого, в результате введения фармацевтической композиции.

В настоящем описании фармацевтическая композиция не ограничена фармацевтической композицией, содержащей связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, и она может представлять собой экспрессирующую химерный антигенный рецептор (также обозначенный ниже в настоящем описании как «CAR») Т-клетку (также обозначенную ниже в настоящем описании просто как «CAR-Т-клетка»), полученную путем интродукции гена, кодирующего CAR, в нормальные Т-клетки периферической крови (Т-лимфоциты периферической крови). CAR представляет собой химерный белок, образованный путем искусственного слияния антитела, которое распознает антиген клеточной поверхности раковых клеток, с областью передачи сигнала, который индуцирует Т-клеточную активацию. CAR-Т-клетки получают путем интродукции кодирующего CAR гена в Т-лимфоциты периферической крови. Экспрессирующие CAR Т-клетки, полученные с помощью такого подхода, применяют для лечения заболеваний, таких как разные виды рака, путем адаптивной иммунотерапии. Указанные CAR-Т-клетки реагируют на экспрессирующие антиген клетки-мишени и приобретают способность повреждать клетки-мишени без зависимости от взаимодействия с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС).

Во всем мире продолжаются клинические испытания иммунотерапии рака путем введения CAR-Т-клеток, более конкретно терапии, которая включает сбор Т-клеток из организма пациентов и интродукцию в эти Т-клетки гена, кодирующего CAR, которые затем культивируют и размножают и переносят вновь в организм пациентов (NPL 1). Были получены результаты, которые продемонстрировали эффективность иммунотерапии рака путем введения CAR-Т-клеток, например, в отношении гематопоэтической злокачественной опухоли, такой как лейкоз или лимфома. В 2017

году Kymriah (зарегистрированный товарный знак) (фирма Novartis, тисагенлеклейцел, CTL-019, CD3 дзета-CD137) и Yescarta (зарегистрированный товарный знак) (фирма KiTE, аксикабтаген цилолейцел, CD3 дзета-CD28), которые представляют собой CAR-T против CD19 в качестве антигена, одобрены в качестве фармацевтических средств в США.

Опубликованы данные о CRS и высвобождении цитокинов в результате противораковой иммунотерапии, основанной на введении CAR-T-клеток (Lee D.W. и др., Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. Blood. 124(2), 10 июля 2014 г., сс. 188-195). Поскольку можно предположить, что одинаковый механизм CRS инициируется, когда вводят фармацевтическую композицию, содержащую связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, и когда вводят CAR-T-клетки, то должно быть очевидно, что введение ингибитора VEGF может предупреждать, ослаблять или лечить синдром выброса цитокинов (CRS), ассоциированный с введением CAR-T-клеток.

Следует отметить, что все характеризующие известный уровень техники документы, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки.

Примеры

Пример 1

Воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на лекарственную эффективность антитела-аналога ERY974 (GC33/2C11)

Опыт с использованием сингенной мышиной модели для оценки воздействия совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 DC101 (производство фирмы Bio X Cell (US)) на лекарственную эффективность антитела-аналога ERY974 осуществляли следующим образом. GC33/2C11 (антитело, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 433 в качестве тяжелой цепи GPC3-плеча, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 434 в качестве легкой цепи GPC3-плеча, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 435 в качестве тяжелой цепи CD3-плеча и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 436 в качестве легкой цепи CD3-плеча) применяли в качестве антитела-аналога ERY97.

Раковые клетки MC38/hGPC3, которые представляют собой мышиную раковую линию клеток MC38, созданную так, что она обладает высоким уровнем экспрессии GPC3, трансплантировали подкожно мышам линии C57BL/6J. День трансплантации принимали за день 0. В день 14 мышей разделяли на четыре группы в зависимости от

размера опухолей. Группы мышей подвергали следующим обработкам в хвостовую вену в день 14 и день 18: (1) наполнитель, (2) GC33/2C11 (5 мг/кг), (3) антитело к мышиному VEGFR2 (DC101) (10 мг/кг) или (4) GC33/2C11 (5 мг/кг) и антитело к мышиному VEGFR2 (10 мг/кг) соответственно.

В результате установлено, что совместное применение GC33/2C1 и антитела к мышиному VEGFR2 повышало лекарственную эффективность по сравнению с вариантом, в котором каждое антитело применяли в качестве индивидуального лекарственного средства (фиг. 1).

Пример 2

Воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолью цитокинов в результате обработки антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11)

Опыт с использованием сингенной мышиной модели для оценки воздействия совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство опухолевой тканью цитокинов в результате обработки антителом-аналогом ERY974 осуществляли следующим образом.

Раковые клетки MC38/hGPC3, которые представляют собой мышиную раковую линию клеток MC38, созданную так, что она обладает высоким уровнем экспрессии GPC3, трансплантировали подкожно мышам линии C57BL/6J. День трансплантации принимали за день 0.

В день 13 мышей разделяли на четыре группы в зависимости от размера опухолей. Группы мышей подвергали следующим обработкам в хвостовую вену в день 13: (1) наполнитель, (2) GC33/2C11 (5 мг/кг), (3) антитело к мышиному VEGFR2 (DC101) (10 мг/кг) или (4) GC33/2C11 (5 мг/кг) и антитело к мышиному VEGFR2 (10 мг/кг). Образцы крови собирали у мышей до и через 2 ч, 6 ч и 24 ч после введения антител, извлекали компоненты плазмы и количественно измеряли уровень цитокинов в плазме. Для измерения цитокинов применяли реагент Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (панель 1 магнитных гранул с мышиными цитокинами/хемокинами) (фирма Millipore), и измерения осуществляли с использованием системы MAGPIX® xPONT 4.2 (фирма Merck).

В результате установлено, что количество продуцированных опухолями цитокинов имело тенденцию к снижению в группе, которую обрабатывали комбинацией GC33/2C11 и антитела к мышиному VEGFR2, по сравнению с группой, которую обрабатывали только GC33/2C11. Отсюда можно предположить, что

применение в комбинации ингибитора ангиогенеза снижает количество продуцированных опухолями цитокинов, образовавших в результате обработки ERY974 (фиг. 2А-2Д).

Пример 3

Воздействие совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство здоровой тканью цитокинов в результате обработки антителом-аналогом ERY974 (GC33/2C11)

Опыт с использованием мышей с «нокином» человеческого GPC3 для оценки воздействия совместного применения антитела к мышиному VEGFR2 (DC101) на производство здоровой тканью цитокинов в результате обработки антителом-аналогом ERY974 осуществляли следующим образом.

Экспрессирующие человеческий GPC3 мыши с «нокином» человеческого GPC3 экспрессируют человеческий GPC3 в условиях контроля экспрессии мышиным промотором GPC3 (WO 2018/038046). При этом, известно, что мыши и люди имеют общие GPC3-позитивные ткани. Невысокий уровень экспрессии GPC3 в легких является характерным и для людей, и для мышей (Clin. Cancer. Res 10, 2004, 8630-8640). Вследствие этого, введение GC33/2C11 мышам с «нокином» человеческого GPC3, описанное выше, и измерение количества продуцированных цитокинов, позволяет прогнозировать и оценивать механизм производства цитокинов здоровой тканью у людей после введения ERY974.

Экспрессирующие человеческий GPC3 мыши с «нокином» человеческого GPC3 разделяли на четыре группы и подвергали следующим обработкам в хвостовую вену: (1) наполнитель, (2) GC33/2C11 (5 мг/кг), (3) антитело к мышиному VEGFR2 (10 мг/кг) или (4) GC33/2C11 (5 мг/кг) и антитело к мышиному VEGFR2 (10 мг/кг). Образцы крови собирали у мышей до и через 2 ч после введения антител, извлекали компоненты плазмы и количественно измеряли уровень цитокинов в плазме. Для измерения цитокинов применяли реагент Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (фирма Millipore), и измерения осуществляли с использованием системы MAGPIX® xPONT 4.2 (фирма Merck).

В результате установлено, что количество продуцированных здоровой тканью цитокинов имело тенденцию к снижению в группе, которую обрабатывали комбинацией GC33/2C11 и антитела к мышиному VEGFR2, по сравнению с группой, которую обрабатывали только GC33/2C11. Отсюда можно предположить, что применение в комбинации ингибитора ангиогенеза снижает количество

продуцированных здоровой тканью цитокинов, образовавших в результате обработки ERY974 (фиг. 3).

Промышленная применимость

Настоящее изобретение можно применять для предупреждения, ослабления или лечения нежелательных реакций, которые вызываются производством цитокинов, ассоциированным с введением связывающихся с Т-клеточным антигеном молекул антител и т.п. Связывающиеся с Т-клеточным антигеном молекулы антител привлекают внимание в качестве средств для лечения рака. Таким образом, некоторые варианты осуществления изобретения, указанные в настоящем описании, можно применять для лечения рака с помощью связывающихся с Т-клеточным антигеном молекул антител.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающуюся с Т-клеточным антигеном молекулу антитела, где ее применение в комбинации с ингибитором сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) предупреждает и/или ослабляет, и/или лечит синдром выброса цитокинов и/или высвобождение цитокинов.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где ингибитор VEGF вводят до, одновременно или после введения фармацевтической композиции.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где ингибитор VEGF вводят за 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения фармацевтической композиции или в тот же день, но до введения фармацевтической композиции.

4. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-3, где ингибитор VEGF выбран из группы, состоящей из анти-VEGF антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR1 антигенсвязывающей молекулы, анти-VEGFR2 антигенсвязывающей молекулы, слитого белка, содержащего рецептор VEGF или его фрагмент, и ингибитора тирозинкиназы.

5. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-4, где ингибитор VEGF выбран из группы, состоящей из бевацизумаба, рамуцирумаба и афлиберцепта.

6. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-5, где кортикостероид не вводят до или одновременно с введением фармацевтической композиции.

7. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-5, где кортикостероид вводят дополнительно до, одновременно или после введения фармацевтической композиции.

8. Фармацевтическая композиция по п. 6 или п. 7, где кортикостероид представляет собой дексаметазон, его фармацевтически приемлемую соль или его производное.

9. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-8, , в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; и

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении ракового антигена.

10. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-9, в которой связывающаяся с Т-клеточным антигеном молекула антитела представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(1) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

(2) домен, который содержит вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3; и

(3) домен, который содержит Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора.

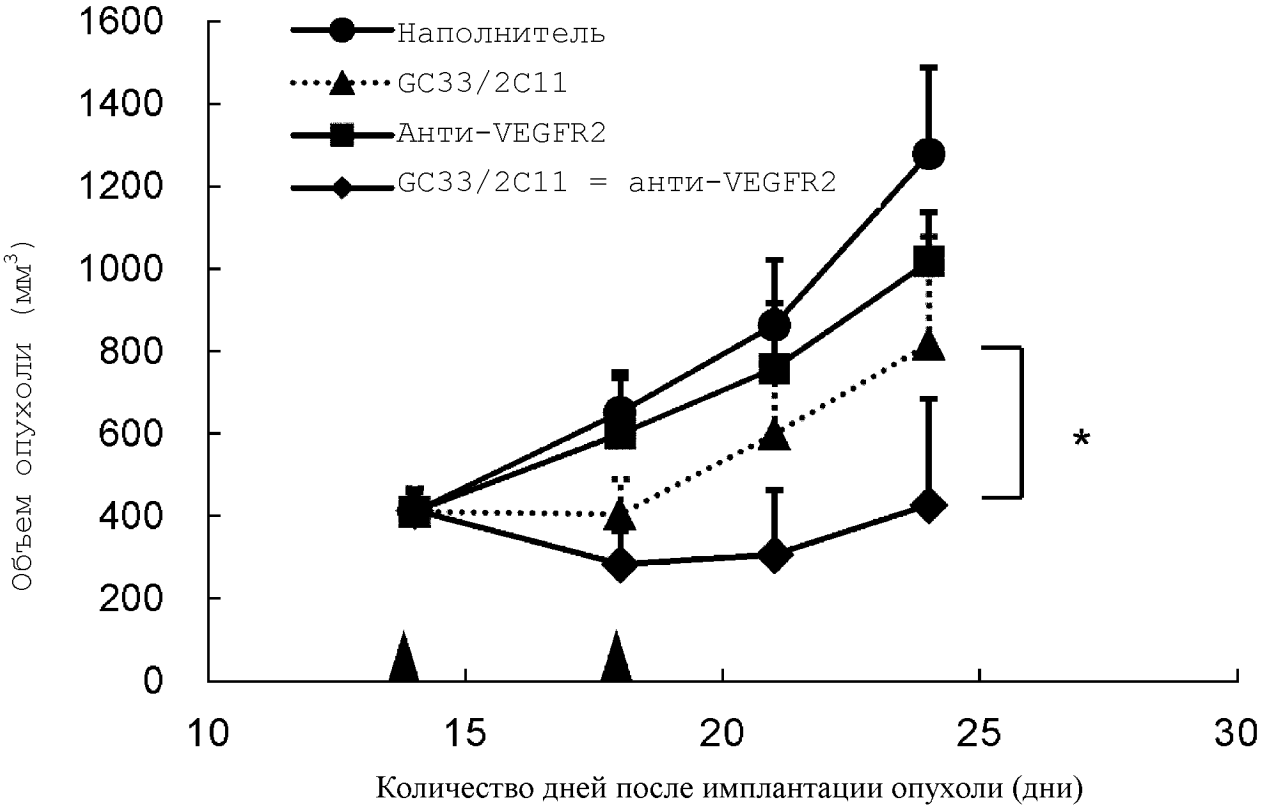
11. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1-10 , которая предназначена для лечения рака.

12. Фармацевтическая композиция по п. 11, противоопухолевое действие которой повышается при совместном применении по сравнению с применением фармацевтической композиции или ингибитора VEGF в качестве индивидуального лекарственного средства.

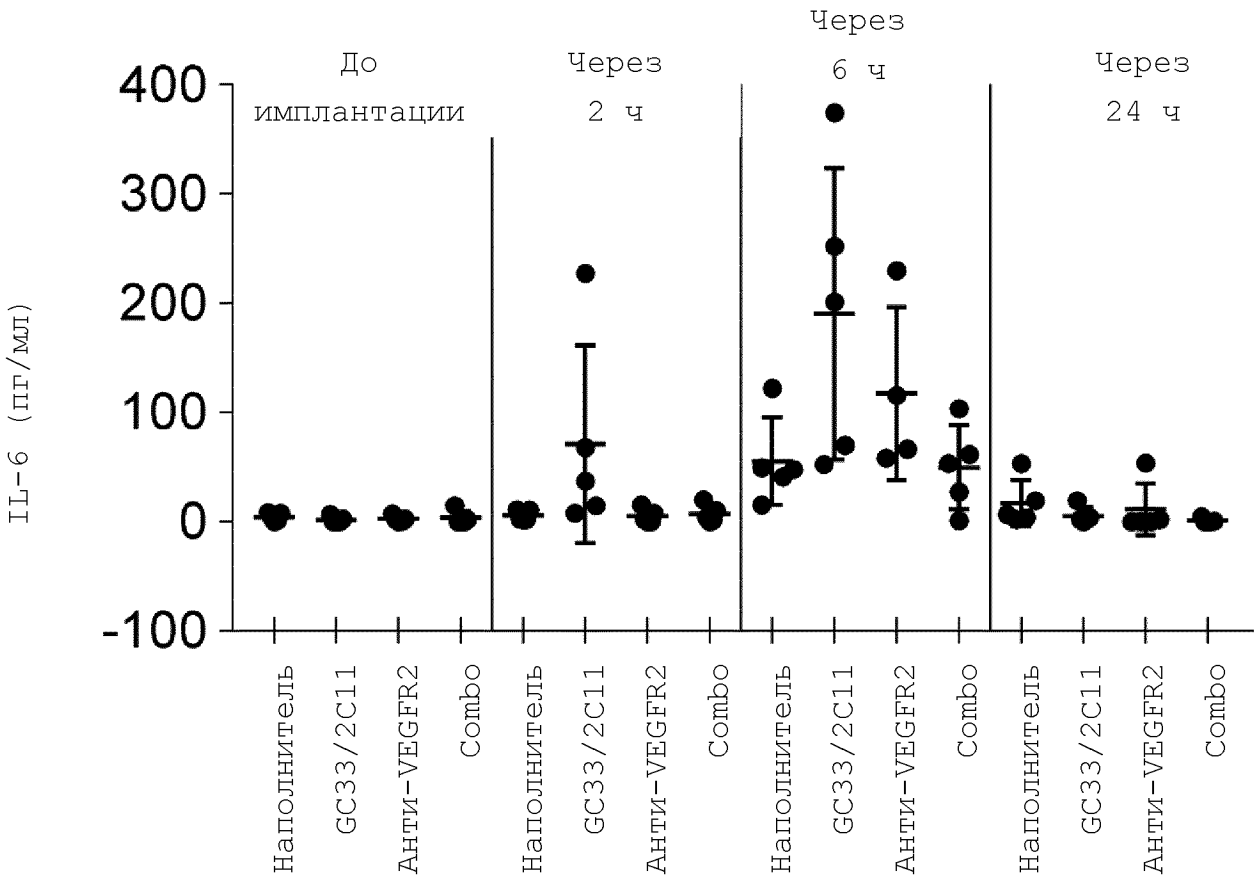
13. Фармацевтическая композиция по одному из п.п. 1 -11, где синдром выброса цитокинов обусловлен высвобождением цитокинов либо из неопухолевой ткани, либо из опухолевой ткани, либо из обоих типов тканей.

14. Фармацевтическая композиция по п. 13, где опухолевая ткань содержит экспрессирующие GPC3 клетки.

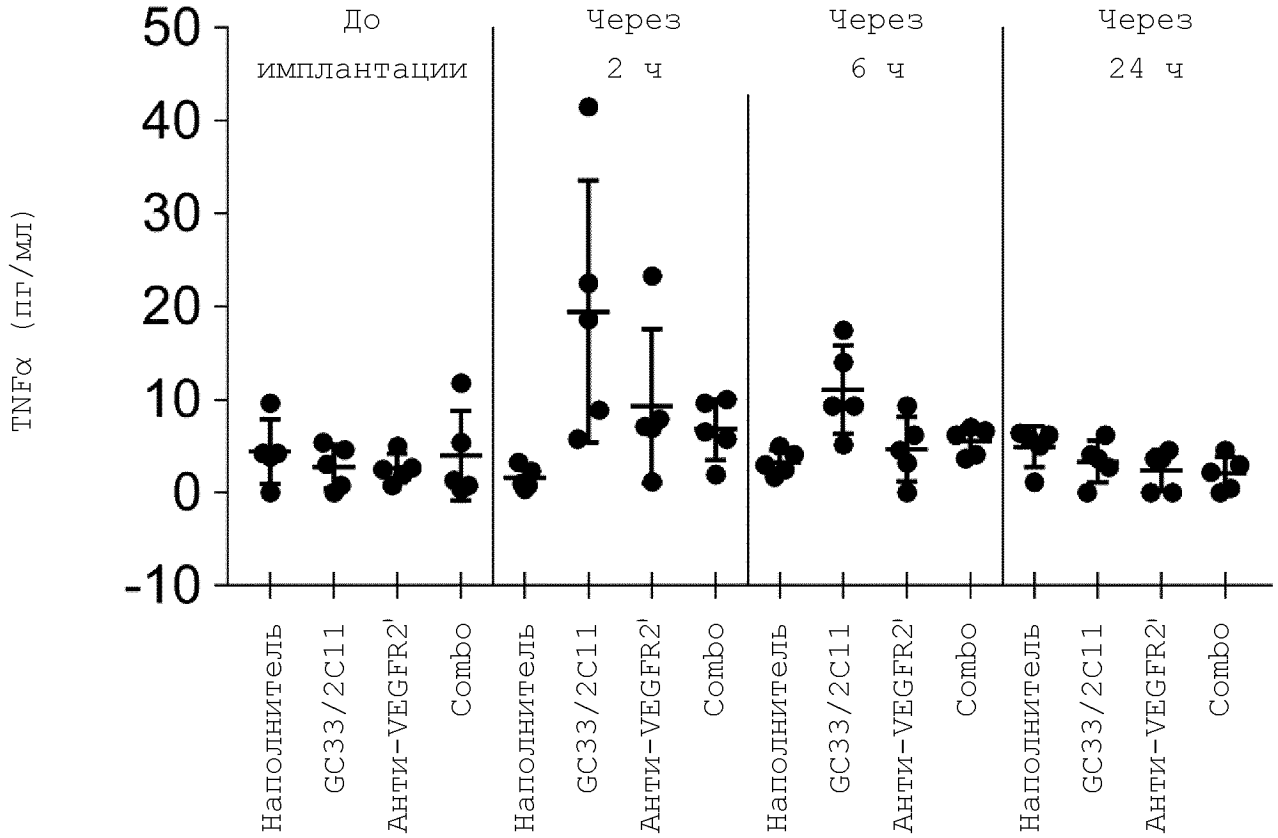
15. Ингибитор VEGF, предназначенный для предупреждения и/или ослабления, и/или лечения синдрома выброса цитокинов и/или высвобождения цитокинов


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
15
20
25
30
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
GC33/2C11 = анти-VEGFR2
Объем опухоли (мм3)
Количество дней после имплантации опухоли (дни)
*

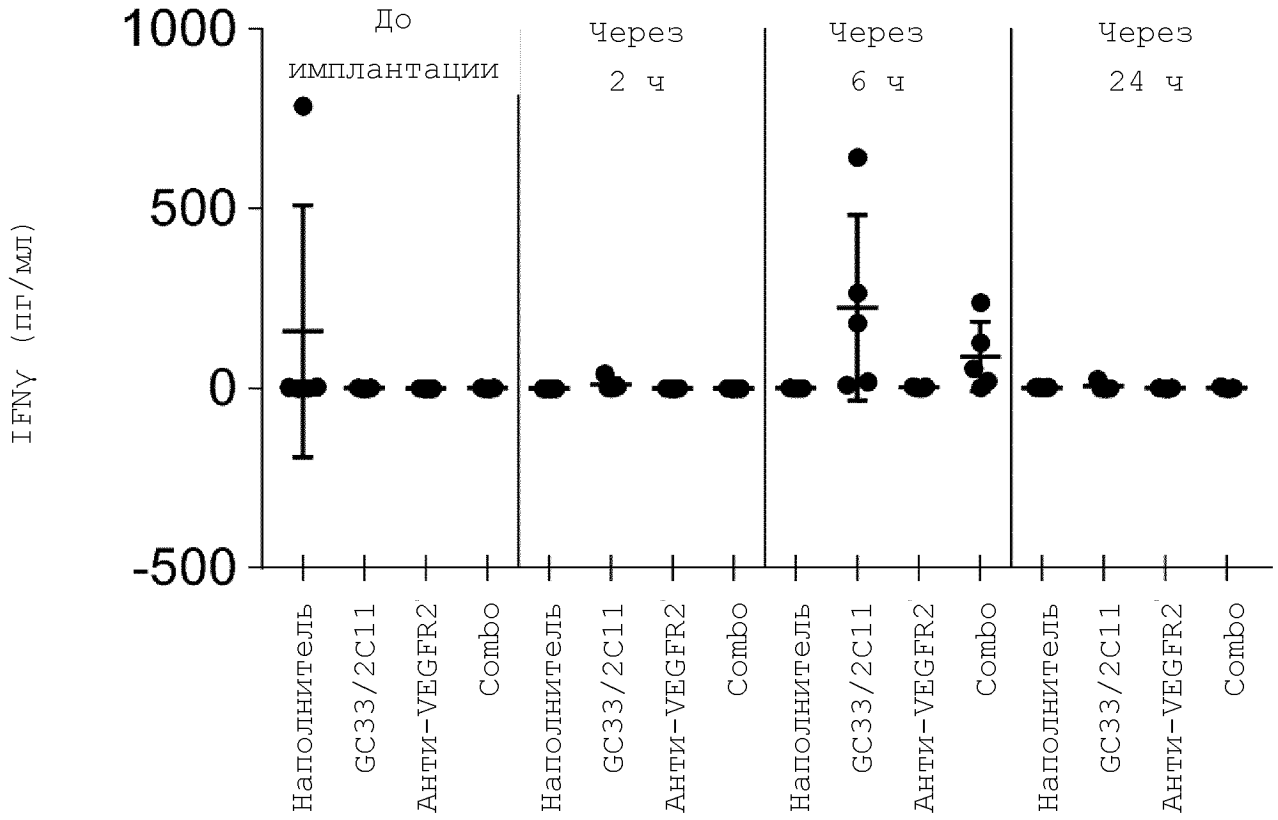
Фиг. 1


IL-6 (пг/мл)
400
300
200
100
0
-100
До имплантации
Через 2 ч
Через 6 ч
Через 24 ч
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo

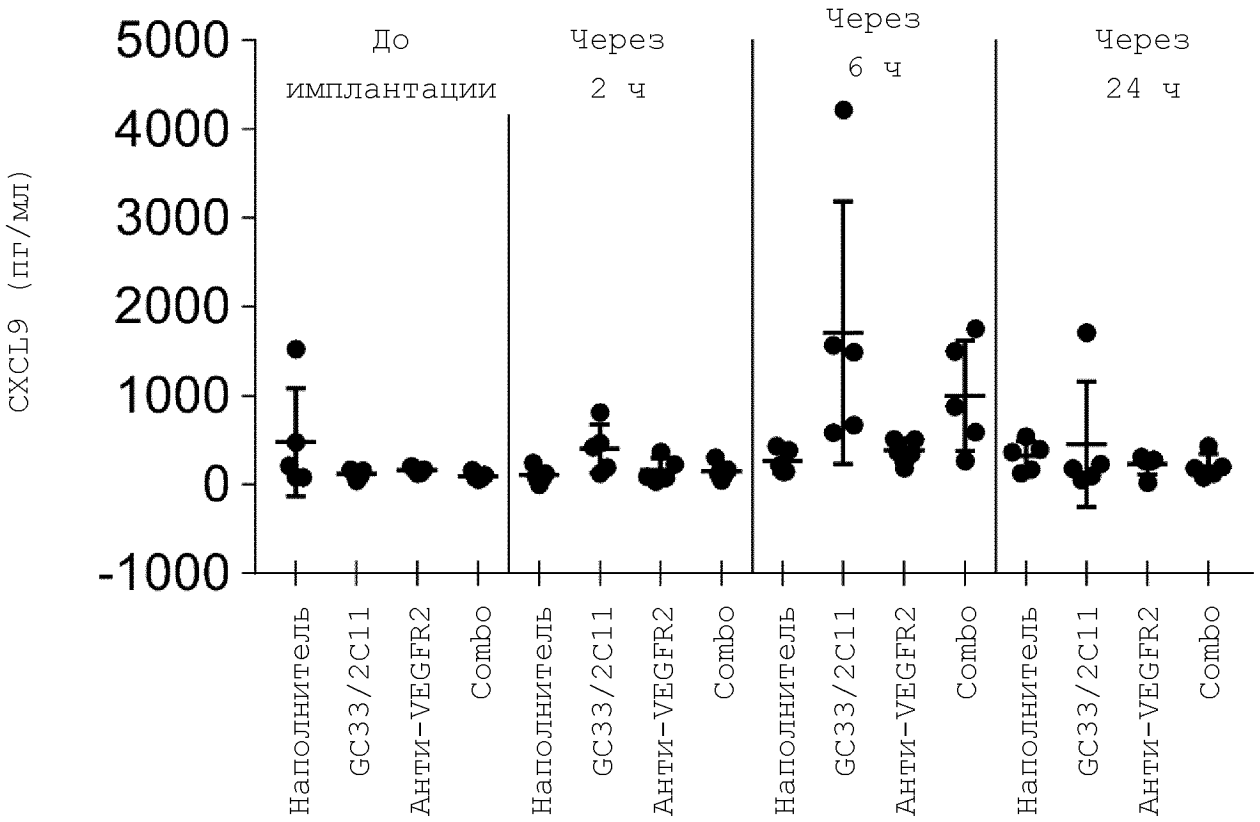
Фиг. 2A


TNFα (пг/мл)
50
40
30
20
10
0
-10
До имплантации
Через 2 ч
Через 6 ч
Через 24 ч
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2'
Combo

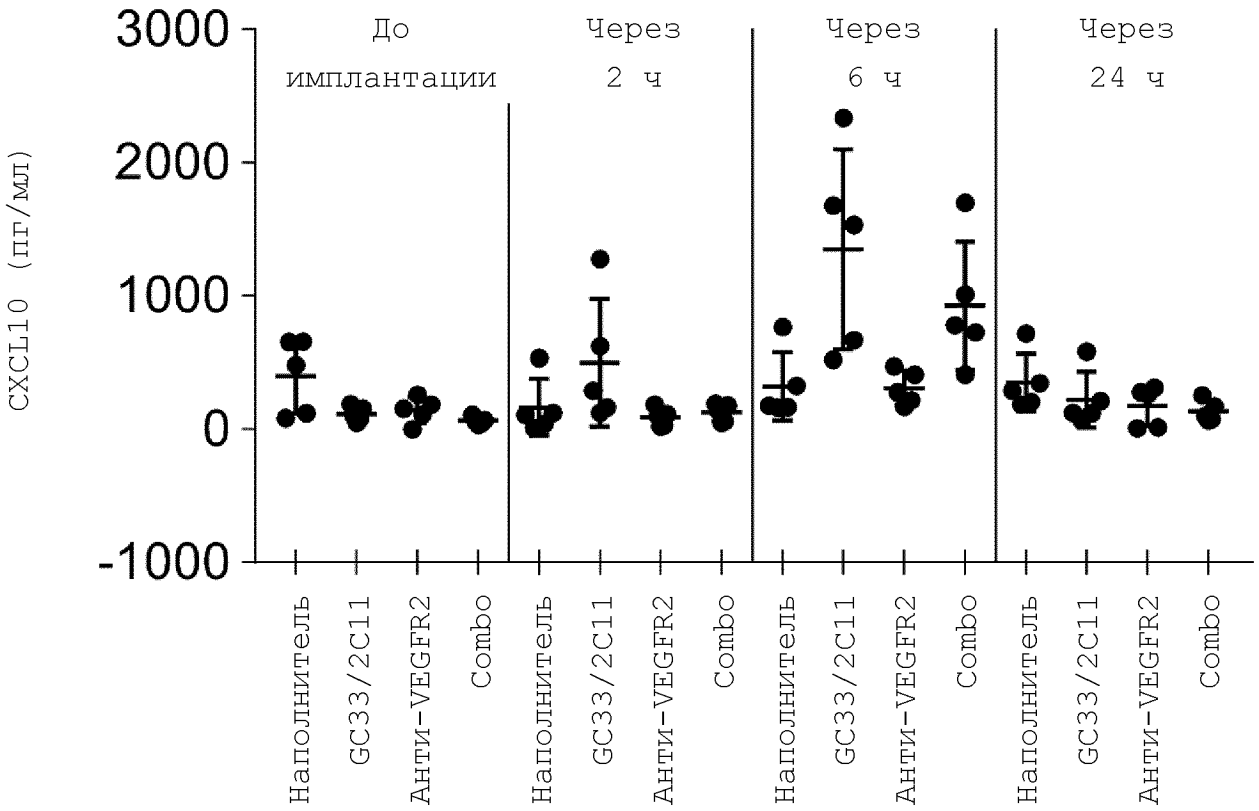
Фиг. 2Б


1000
500
0
-500
IFNγ (пг/мл)
До имплантации
Через 2 ч
Через 6 ч
Через 24 ч
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo

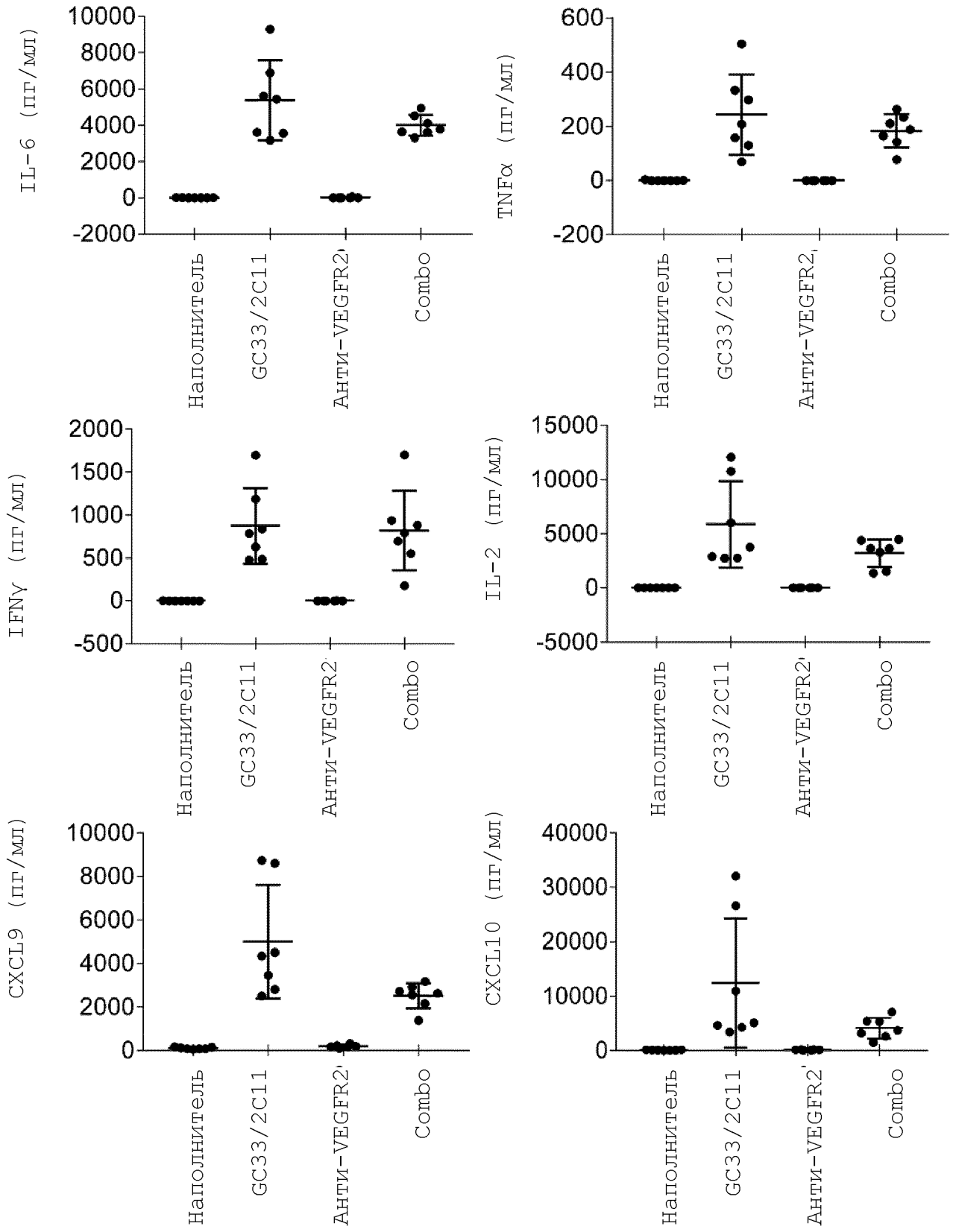
Фиг. 2B


CXCL9 (пг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
До имплантации
Через 2 ч
Через 6 ч
Через 24 ч
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo

Фиг. 2Г


CXCL10 (пг/мл)
3000
2000
1000
0
-1000
До имплантации
Через 2 ч
Через 6 ч
Через 24 ч
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo

Фиг. 2Д


IL-6 (пг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
TNFα (пг/мл)
600
400
200
0
-200
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
IFNγ (пг/мл)
2000
1500
1000
500
0
-500
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
IL-2 (пг/мл)
15000
10000
5000
0
-5000
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
CXCL9 (пг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo
CXCL10 (пг/мл)
40000
30000
20000
10000
0
Наполнитель
GC33/2C11
Анти-VEGFR2
Combo

Фиг. 3

Обозначение антитела	Kabat CDR L1 / Chothia CDR L1																															Контактные CDR L1						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
L0000	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0011	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	P	L	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0201	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	P	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0203	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	I	H	W	Y
L0204	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0206	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0208	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0209	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	I	H	W	Y
L0211	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	P	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0212	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	P	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	L	H	W	Y
L0222	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	P	V	H	S	-	N	R	N	T	Y	I	Q	W	Y
L0272	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	P	L	V	H	S	-	N	R	Q	T	Y	L	H	W	Y

Обозначение антитела	Kabat CDR L2 / Chothia CDR L2									Контактные CDR L2																													
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
L0000	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0011	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0201	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0203	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0204	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	R	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0206	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0208	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	W	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0209	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0211	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0212	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0222	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V
L0272	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V

Обозначение антитела	Kabat CDR L3 / Chothia CDR L3 / Контактные CDR L3																																		
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	95c	95d	95e	95f	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
L0000	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	G	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0011	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	G	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0201	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	G	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0203	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	G	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0204	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	G	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0206	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Y	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0208	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Y	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0209	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Y	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0211	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Y	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0212	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Y	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0222	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Y	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
L0272	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	G	Q	G	T	Q	V	P	-	-	-	-	-	-	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K

Фиг. 4