



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/395 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018106876, 27.07.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2016

Дата регистрации:
08.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.07.2015 US 62/198,384;
21.06.2016 US 62/352,637

(43) Дата публикации заявки: 28.08.2019 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 08.02.2021 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.02.2018

(86) Заявка РСТ:
IB 2016/054487 (27.07.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/017623 (02.02.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ФЬЕЛЛСКОГ, Мари-Луиз (US),
КЭМЕРОН, Джон (US),
ЦАО, Чжу (US),
ЧИПОЛЛЕТТА, Даниэла (US),
МАКАЙЗЕК, Кензи (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Y. ZHU et al. "CSF1/CSF1R Blockade
Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages; and
Improves Response to T-cell Checkpoint
Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models";
CANCER RESEARCH; vol. 74, no. 18, 31 July
2014 (2014-07-31), pages 5057-5069, XP055242334,
US; ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-
5472.CAN-13-3723. RU 2456990, 27.07.2012. RU
2450018, (см. прод.)

(54) НОВАЯ КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО
НОВООБРАЗОВАНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и
медицине, в частности к фармацевтической
композиции, содержащей антитело против PD-1
и антитело против M-CSF. Комбинация может
вводиться независимо или раздельно в количестве,
которое является терапевтически эффективным

для лечения злокачественного новообразования.
Изобретение позволяет расширить арсенал
средств для лечения злокачественных
новообразований. 5 н. и 14 з.п. ф-лы, 8 табл., 9
пр., 1 ил.

(56) (продолжение):
27.02.2014.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/395 (2020.08)(21)(22) Application: **2018106876, 27.07.2016**(24) Effective date for property rights:
27.07.2016Registration date:
08.02.2021

Priority:

(30) Convention priority:
29.07.2015 US 62/198,384;
21.06.2016 US 62/352,637(43) Application published: **28.08.2019 Bull. № 25**(45) Date of publication: **08.02.2021 Bull. № 4**(85) Commencement of national phase: **28.02.2018**(86) PCT application:
IB 2016/054487 (27.07.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/017623 (02.02.2017)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

FJAELLSKOG, Marie-Louise (US),
CAMERON, John (US),
CAO, Zhu (US),
CIPOLLETTA, Daniela (US),
MACISAAC, Kenzie (US)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)(54) **A NEW COMBINATION FOR USE IN THE TREATMENT OF MALIGNANT NEOPLASMS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, medicine.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and medicine, in particular to a pharmaceutical composition containing an antibody against PD-1 and an antibody against M-CSF. The combination can be administered independently or separately in an amount

that is therapeutically effective for malignant neoplasm treatment.

EFFECT: invention makes it possible to expand the arsenal of drugs for malignant neoplasm treatment.

19 cl, 8 tbl, 9 ex, 1 dwg

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится, отчасти, к фармацевтической композиции, содержащей антагонист PD-1 и антагонист M-CSF. Настоящую комбинацию вводят независимо или раздельно, в количестве, которое является терапевтически эффективным для лечения злокачественного новообразования. Изобретение дополнительно относится к применению такой комбинации для производства лекарственного средства; применению такой комбинации в качестве лекарственного препарата; набору частей, содержащих такую комбинацию; и способу лечения, включающему комбинацию.

Предшествующий уровень техники

Необходимы более эффективные способы лечения злокачественных солидных опухолей. Иммуноterapiи, которые нацелены на контрольные точки иммунного ответа, в настоящее время являются перспективными в качестве основных средств при терапии злокачественных новообразований. Антитела, ингибирующие цитотоксический белок, ассоциированный с Т-лимфоцитами типа 4 (CTLA-4), и белок программируемой смерти типа 1 (PD-1), также известные как ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, продемонстрировали эффективность у некоторых пациентов со злокачественным новообразованием. Пациенты и типы опухолей имели сильно варьирующие ответы, с наивысшими степенями ответа, наблюдаемыми при прогрессирующей меланоме. Наблюдали как иммунологическую толерантность к ингибированию контрольных точек, а также первоначальный ответ, с последующим прогрессированием, указывающим на присутствие первичной резистентности и индуцированной терапией приобретенной резистентности. Для пациентов с меланомой, заболевание которых прогрессирует на ингибиторах контрольных точек иммунного ответа CTLA-4, PD-1 или PD-L1, необходимы другие варианты лечения, которые могут стабилизировать или обратить прогрессирование заболевания.

Одним видом злокачественного новообразования, который может иметь благоприятный ответ от лечения с использованием антитела, ингибирующего контрольную точку, является рак молочной железы, наиболее часто встречающийся вид рака среди женщин во всем мире, с учтенными 1,38 миллиона новых случаев в 2008 г., и он также является наиболее частой причиной смерти от рака у женщин с 458000 смертными случаями. Третьи негативный рак молочной железы (TNBC) приходится на приблизительно 15% впервые диагностированных злокачественных новообразований молочной железы, но вследствие его агрессивной природы сообщается о диспропорциональном количестве (25%) случаев TNBC при терапии метастатических форм рака. TNBC характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) и отсутствием сверхэкспрессии рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2).

Клиническое течение болезни для TNBC ассоциировано с высокой вероятностью отдаленных метастазов, особенно, в легком и мозге. В настоящее время не существует каких-либо целенаправленных терапий для этого подтипа рака молочной железы, и единственным вариантом лечения является химиотерапия. Даже несмотря на то, что в некоторых исследованиях предполагают, что TNBC является в высокой степени хемочувствительным заболеванием, прогноз все еще остается неблагоприятным с более коротким интервалом без заболевания после первоначальной терапии и более агрессивным клиническим течением болезни при терапии метастатических форм рака. Большинство пациентов получают антрациклины и таксаны при вспомогательном лечении, и никакого дополнительного стандартного лечения не существует для пациентов с метастатическим TNBC. Однако появившиеся данные позволяют

предположить, что соли платины (т.е., цисплатин и карбоплатин) являются высокоактивными при раннем и прогрессирующем TNBC, и, следовательно, широко применяются в клинических условиях. Медиана выживаемости для метастатического TNBC составляет приблизительно 1 год, что делает TNBC заболеванием с высокой степенью неудовлетворенной медицинской потребности. Дополнительные виды злокачественных новообразований с высокой степенью неудовлетворенных потребностей пациентов также включают пациентов со злокачественным новообразованием поджелудочной железы (особенно пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы) или карциномой эндометрия. Существует потребность в разработке новых комбинационных терапий, которые могут применяться для лечения злокачественных новообразований.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено, отчасти, на комбинацию антагониста макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) и антагониста белка программируемой смерти типа 1 (PD-1), которая может обеспечить преимущественный эффект для лечения злокачественного новообразования. Комбинацию антагониста M-CSF и антагониста PD-1 применяют при лечении злокачественного новообразования, включающего трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак кожи, рак яичника злокачественные новообразования поджелудочной железы, глиобластому (GBM), рак легких, почечно-клеточную карциному, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), мезотелиому, рак эндометрия и назофарингеальную карциному (NPC), или злокачественного новообразования, которое стало резистентным или рефрактерным к терапии с использованием PD-1 или PD-L1, такого как TNBC или меланома.

В одном другом аспекте, изобретение включает фармацевтическую комбинацию, описанную выше, для применения при лечении злокачественного новообразования, включающего трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак кожи, рак яичника злокачественные новообразования поджелудочной железы, глиобластому (GBM), рак легких, почечно-клеточную карциному, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), мезотелиому и назофарингеальную карциному (NPC), или злокачественного новообразования, которое стало резистентным, рецидивирующим или рефрактерным к другим терапиям, особенно, к терапии с использованием PD-1 или PD-L1, такого как TNBC или меланома. Комбинация согласно изобретению может применяться для лечения рака легких, включающего немелкоклеточный рак легких и плоскоклеточный рак легких. Фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным. Злокачественные новообразования молочной железы включают позитивный к эндокринному рецептору (рецептору эстрогена или прогестерона) рак, HER2-позитивный рак, трижды негативный (не позитивный к рецепторам эстрогена, прогестерона или HER2) рак или трижды позитивный (позитивный к рецепторам эстрогена, рецепторам прогестерона и HER2) рак, и комбинация согласно настоящему изобретению является особенно применимой против трижды негативного рака молочной железы. Злокачественные новообразования поджелудочной железы принадлежат в основном к типу аденокарциномы или карциномы, которые представляют собой экзокринные злокачественные новообразования. Экзокринные злокачественные новообразования поджелудочной железы включают аденокарциному поджелудочной железы, ацинарно-клеточную карциному поджелудочной железы, цистаденокарциномы, панкреатобластомные аденосквамозные карциномы, перстневидно-клеточные карциномы, гепатоидные карциномы, коллоидные карциномы, недифференцированные карциномы,

недифференцированные карциномы с остеокласт-подобными гигантскими клетками, солидную псевдопапиллярную опухоль и слизеобразующие кистозные новообразования поджелудочной железы.

В одном варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения рака молочной железы, такого как позитивный к эндокринному рецептору (рецептору эстрогена или прогестерона), HER2-позитивный, трижды негативный (не позитивный к рецепторам эстрогена, прогестерона или HER2) или трижды позитивный (позитивный к рецепторам эстрогена, рецепторам прогестерона и HER2). В одном другом варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения рака яичника. В еще одном другом варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения меланомы, включая меланому. В еще одном другом варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения рака поджелудочной железы. В еще одном другом варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения рака легких, включающего немелкоклеточный рак легких и плоскоклеточный рак легких. В одном другом варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения злокачественного новообразования, которое стало резистентным или рефрактерным к терапии с использованием PD-1 или PD-L1, такого как TNBC или меланома. В еще одном другом варианте осуществления, фармацевтическая комбинация, описанная в настоящем документе, включает количество, которое является терапевтически эффективным для лечения.

В одном другом аспекте, изобретение включает фармацевтическую комбинацию, описанную в настоящем документе, для применения при лечении злокачественного новообразования, такого как рак молочной железы, включающего трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак кожи, рак яичника, злокачественные новообразования поджелудочной железы, глиобластому (GBM), рак легких, почечно-клеточную карциному, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), мезотелиому и назофарингеальную карциному (NPC), или злокачественного новообразования, которое стало резистентным или рефрактерным к терапии с использованием PD-1 или PD-L1, такого как TNBC или меланома.

В одном другом аспекте, изобретение включает применение фармацевтической комбинации, описанной в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, такого как рак молочной железы, включающего трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак кожи, рак яичника, злокачественные новообразования поджелудочной железы, глиобластому (GBM), рак легких, почечно-клеточную карциному, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), мезотелиому и назофарингеальную карциному (NPC), или злокачественного новообразования, которое стало резистентным или рефрактерным к терапии с использованием PD-1 или PD-L1, такого как TNBC или меланома.

Краткое описание чертежей

ФИГ. 1 показывает данные Rnaseq и TCGA и внутренних баз данных, показывающие

высокий уровень экспрессии суррогатного маркера для M2 макрофагов, CD163, внутри конкретных популяций пациентов, определяемых по наивысшему уровню экспрессии PD1 (прямоугольник).

Подробное описание изобретения

5 Существует потребность в новых комбинациях, которые могут применяться для лечения злокачественного новообразования. Настоящее изобретение направлено на комбинацию антагониста M-CSF, такого как молекула антитела против M-CSF, и антагониста PD-1, такого как молекула антитела против PD-1, которая может
10 применяться для лечения злокачественных новообразований. Без ограничения какой-либо теорией полагают, что применение новой комбинации, раскрытой в настоящем документе, для лечения конкретного злокачественного новообразования, является преимущественным, так как она воздействует на иммунный ответ, восстанавливая противоопухолевый ответ Т-клеток, и расширяя эндогенный противоопухолевый ответ Т-клеток. Как показано на ФИГ. 1, после активации Т-клетки увеличивают экспрессию
15 PD-1 на их поверхности, что позволяет им получать отрицательный сигнал, ингибируя посредством этого ответы Т-клеток. Опухолевые клетки используют преимущество этой системы посредством экспрессии партнеров связывания PD-1, такого как PD-L1, что преждевременно выключают ответы Т-клеток против опухоли. В настоящей комбинации, молекула антитела против PD1 распознает и связывает PD-1 на Т-клетках,
20 предотвращая посредством этого опухолевые клетки от связывания с PD-1 и снижая активность Т-клеток. Молекула антитела против PD-1 связывается с Т-клетками, но не препятствует функции Т-клеток, таким образом, обеспечивая то, что Т-клетки сохраняют их воздействие по уничтожению опухоли. Антитело против M-CSF, в свою очередь, усиливает активность Т-клеток посредством воздействия на различные оси
25 клетки. В месте локализации опухоли, опухолеассоциированные макрофаги (TAMS) секретируют цитокины для ингибирования выработки IL-2 и пролиферации Т-клеток паракринным образом. Применение антител против M-CSF высвобождает разрыв с компартментом Т-клеток посредством истощения M2-макрофагов, которые могут подавлять функцию Т-клеток и пролиферацию через выработку иммуномодуляторных
30 цитокинов. Таким образом, полагают, что комбинация молекулы антитела против MSCF и молекулы антитела против PD1 восстанавливает функцию истощенных Т-клеток, которая была нарушена опухолевыми клетками и M2-макрофагами, приводя к преимущественному лечебному воздействию у пациентов с опухолями. Новые в настоящее время комбинации могут быть применимы при показаниях, где маркер PD-1 и CD163 (маркер макрофагов) экспрессируются или сверхэкспрессируются. Примеры
35 злокачественных новообразований, где комбинация имеет преимущественное воздействие, включают рак яичника, рак молочной железы, например, TNBC, рак поджелудочной железы, меланому, рак легких, такой как немелкоклеточный рак легких и плоскоклеточный рак легких, назофарингеальную карциному (NPC), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), мезотелиому, почечно-клеточную карциному
40 или глиобластому. Кроме того, настоящие комбинации являются применимыми для лечения злокачественных новообразований, которые являются резистентными или рефрактерными к лечению с использованием PD1/PDL-1, включающих меланому и трижды негативный рак молочной железы (TNBC).

45 Таким образом, настоящее изобретение предоставляет, композиции, *например*, фармацевтические композиции, которые включают фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или стабилизатор, и молекулы антитела против PD-1, описанного в настоящем документе, и антитела против M-CSF, как описано в настоящем документе,

и их применения для лечения злокачественного новообразования. В одном варианте осуществления, композиция, *например*, фармацевтическая композиция, включает комбинацию молекул антител против PD-1 и против M-CSF и одно или более средств, *например*, терапевтическое средство или молекулу другого антитела, как описано в

Определения

Термин "Белок программируемой смерти типа 1" или "PD-1" включает изоформы у млекопитающих, *например*, человеческий PD-1, виды гомологов человеческого PD-1 и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-1. Аминокислотная последовательность PD-1, *например*, человеческого PD-1, является известной в данной области, *например*, Shinohara T *et al.* (1994) *Genomics* 23(3):704-6; Finger LR, *et al.* *Gene* (1997) 197(1-2):177-87.

Термин "совместно терапевтически эффективные" означает, что антагонист PD-1, *например*, молекула антитела против PD-1 и антагонист M-CSF, *например*, молекула антитела против M-CSF, могут даваться одновременно (в одной дозированной форме или множестве дозированных форм) или отдельно (в хронологически шахматном порядке, особенно, специфичном к последовательности) при таких временных интервалах, которые являются предпочтительными, субъекту, особенно, человеку, подлежащему лечению, и все еще показывают (предпочтительно улучшенное или синергическое) взаимодействие. В одном варианте осуществления, комбинация при введении показывает улучшенный терапевтический ответ при сравнении с терапевтическим ответом при введении в виде монотерапии субъекту со злокачественным новообразованием.

Как применяют в настоящем описании, артикли "а" и "an" относятся к одному или более одного (*например*, к по меньшей мере одному) грамматическому объекту артикля.

Термин "или" применяют в настоящем описании для обозначения и применяют взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекст явным образом не указывает на иное.

"Около" и "приблизительно" будут, как правило, означать приемлемую степень ошибки для измеренного количества данного природного объекта или точности измерений. Иллюстративные степени ошибки находятся в пределах 20 процентов (%), обычно, в пределах 10%, и более обычно, в пределах 5% от данного значения или интервала значений.

Композиции и способы согласно настоящему изобретению охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие установленные последовательности, или последовательности идентичные им или сходные с ними по существу, *например*, последовательности, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или выше идентичные с установленной последовательностью. В контексте аминокислотной последовательности, термин "идентичная по существу" применяют в настоящем описании по отношению к первой аминокислотной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных остатков, которые являются i) идентичными с аминокислотными остатками или ii) консервативными заменами выравненных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности, таким образом, что первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. *Например*, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеющий по меньшей мере около 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, с эталонной последовательностью, *например*,

последовательностью, предоставленной в данном описании.

В контексте нуклеотидной последовательности, термин "идентичная по существу" применяют в настоящем описании по отношению к первой последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит достаточное или минимальное число нуклеотидов, которые являются идентичными с выравненными нуклеотидами во второй последовательности нуклеиновой кислоты, таким образом, что первая и вторая нуклеотидные последовательности кодируют полипептид, имеющий общую функциональную активность, или кодируют общий структурный полипептидный домен или общую функциональную полипептидную активность. Например, нуклеотидные последовательности, имеющие по меньшей мере около 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с эталонной последовательностью, *например*, последовательностью, предоставленной в данном описании.

Термин "функциональный вариант" относится к полипептидам, которые имеют идентичную по существу аминокислотную последовательность с природной последовательностью, или кодируются идентичной по существу нуклеотидной последовательностью, и способны иметь одну или более активностей природной последовательности.

Термин "антигенсвязывающий участок" относится к части молекулы антитела, которая содержит детерминанты, которые образуют область контакта, которая связывается с полипептидом PD-1 или M-CSF или их эпитопом. По отношению к белкам (или миметикам белков), антигенсвязывающий участок типовым образом включает одну или несколько петель (из по меньшей мере четырех аминокислот или имитаторов аминокислот), которые образуют область контакта, которая связывается с полипептидом M-CSF или PD-1. Обычно, антигенсвязывающий участок молекулы антитела включает по меньшей мере одну или две CDR и/или гипервариабельные петли, или, более типично, по меньшей мере три, четыре, пять или шесть CDR и/или гипервариабельных петель.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител", как применяют в настоящем описании, относится к получению молекул антител с единственным молекулярным составом. Композиция моноклональных антител проявляет единую специфичность связывания и аффинность для конкретного эпитопа. Моноклональные антитела могут быть получены гибридомной технологией или способами, в которых не применяется гибридомная технология (*например*, рекомбинантными способами).

"Эффективно человеческий" белок представляет собой белок, который не индуцирует ответ, нейтрализующий антитело, *например*, ответ человека против мышинового антитела (НАМА).

"Комбинация" относится к лекарственным формам отдельных партнеров вместе с инструкциями или без инструкций по комбинированному применению или к комбинационным продуктам. Партнеры комбинации могут, таким образом, представлять собой полностью отдельные фармацевтические дозированные формы или фармацевтические композиции, которые также реализуются независимо друг от друга, и, где инструкции по их комбинированному применению обеспечиваются в оборудовании для упаковки, например в виде аннотации к лекарству или т.п., или в виде другой информации, например, предоставляемой терапевтам и медперсоналу (например, устные сообщения, сообщения в письменном виде или т.п.), для одновременного или последовательного применения для совместной активности.

"Комбинационный продукт" включает набор частей для комбинированного введения,

где антитело против PD-1 и антитело против M-CSF могут вводиться независимо в одно и то же время или раздельно в пределах временных интервалов, особенно, где эти временные интервалы обеспечивают то, что партнеры комбинации показывают коллективный (= совместный), например улучшенный, усиленный или синергистический эффект. Термины "совместное введение" или "комбинированное введение" или т.п., как используются в данном описании, означают, что они охватывают введение выбранного партнера комбинации единичному субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и предназначены для включения схем лечения, при которых средства не обязательным образом вводят посредством одинакового пути введения и/или в одно и то же время.

Термин "нефиксированная комбинация" означает, что оба активных ингредиента вводят пациенту в виде раздельных субстанций либо одновременно, параллельно или последовательно без конкретных временных пределов, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух антител в организме пациента. Последнее также применимо к коктейльной терапии, например, введению трех или более активных ингредиентов. Термин "нефиксированная комбинация", таким образом, определяет, в особенности, "набор частей" в том смысле, что партнеры комбинации (i) антитело против PD-1 и (ii) антитело против M-CSF, определенные в данном описании, могут быть дозированы независимо друг от друга или посредством применения различных фиксированных комбинаций с различаемыми количествами партнеров комбинации, т.е. одновременно или при различных временных отметках, где партнеры комбинации могут также применяться в виде полностью раздельных фармацевтических дозированных форм или фармацевтических лекарственных форм, которые также реализуют независимо друг от друга и с инструкциями по возможности их комбинированного применения или обеспечиваются в оборудовании для упаковки, например в виде аннотации к лекарству или т.п., или в виде другой информации, например, предоставляемой терапевтам и медперсоналу. Независимые лекарственные формы или части из набора частей могут затем, например, вводиться одновременно или хронологически в шахматном порядке, который имеет место при различных отметках времени и с равными или различными временными интервалами для любой части из набора частей. Очень предпочтительно, чтобы временные интервалы выбирались таким образом, чтобы воздействие на подвергаемое лечению заболевание при комбинированном применении частей было более сильным, чем воздействие, которое могло бы быть получено посредством применения лишь любого одного из партнеров комбинации (i) и (ii), таким образом, являющихся совместно активными. Отношение общих количеств партнера комбинации (i) к партнеру комбинации (ii), подлежащих введению в комбинированном препарате может варьироваться, например, в том порядке, чтобы удовлетворять потребностям субпопуляции пациентов, подлежащей лечению, или потребностям единственного пациента, различные потребности которого могут быть обусловлены возрастом, полом, массой тела и т.д. пациентов.

Фразы "парентеральное введение" и "вводимые парентерально", как применяют в настоящем описании, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

Термин "изолированное" как применяют в настоящем описании, относится к веществу, которое удаляют из его исходного или нативного окружения (*например*, природного окружения, если вещество является природным). Например, природный полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом животном, не является изолированным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный посредством человеческого вмешательства, из некоторых или всех совместно существующих веществ в природной системе, является изолированным. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могут быть частью композиции, и все еще быть изолированными, если такой вектор или композиция не являются частью окружения, в котором его обнаруживают в природе.

Как применяют в настоящем описании, термин "молекула антитела" относится к белку, *например*, цепи иммуноглобулина или его фрагмента, содержащей по меньшей мере одну последовательность переменного домена иммуноглобулина. Термин "молекула антитела" включает, например, моноклональное антитело (включающее непротессированное антитело, которое имеет Fc область иммуноглобулина). В варианте осуществления, молекула антитела содержит непротессированное антитело, или непротессированную цепь иммуноглобулина. В варианте осуществления, молекула антитела содержит антигенсвязывающий или функциональный фрагмент непротессированного антитела или непротессированную цепь иммуноглобулина. В одном другом примере, молекула антитела включает две последовательности переменного домена тяжелой (H) цепи и две последовательности переменного домена легкой (L) цепи, образуя, таким образом, два антигенсвязывающих участка, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Fd, Fd', Fv, одноцепочечные антитела (scFv, например), антитела с единственным переменным доменом, диатела (Dab) (бивалентные и биспецифические), и химерные (*например*, гуманизированные) антитела, которые могут продуцироваться посредством модификации цельных антител или антитела, синтезируемых *de novo* с использованием технологий рекомбинантных ДНК. Эти функциональные фрагменты антитела сохраняют способность селективно связываться с их соответствующим антигеном или рецептором. Антитела и фрагменты антител могут принадлежать к любому классу антител, включающему, но не ограниченному перечисленными, IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, и любому подклассу (*например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) антител. Получение молекул антител может быть моноклональным или поликлональным. Молекула антитела может также представлять собой человеческое, гуманизированное, CDR-привитое или генерируемое *in vitro* антитело. Антитело может иметь константную цепь тяжелой цепи, выбранную из, *например*, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитело может также иметь легкую цепь, выбранную из, *например*, каппа или лямбда. Термин "иммуноглобулин" (Ig) в настоящем описании применяют взаимозаменяемо с термином "антитело".

Примеры антигенсвязывающих фрагментов молекулы антитела включают: (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одиночного плеча антитела, (v) фрагмент диатела (dAb), который состоит из домена VH; (vi) верблюжий или верблюдилизированный переменный домен; (vii) одноцепочечную Fv (scFv); (viii) однодоменное антитело. Эти фрагменты антитела получают, применяя общепринятые методы, известные квалифицированным специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу на предмет применимости таким же образом, как и интактные

антитела. Термин "антитело" включает интактные молекулы, а также их функциональные фрагменты. Константные области антител могут быть изменены, *например*, подвергнуты мутации, чтобы модифицировать свойства антитела (*например*, для увеличения или уменьшения одного или нескольких из: связывания с Fc-рецептором, гликозилирования антитела, числа остатков цистеина, функции эффекторной клетки или функции комплемента).

Области VH и VL могут быть подразделены на области гипервариабельности, именуемые "области, определяющие комплементарность" (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, именуемыми "каркасные области" (FR или FW).

Степень каркасной области и CDR была точно определена рядом способов (см., Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chotia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; и определением AbM, используемым в программном обеспечении моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См., в целом, *например*, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. In: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg).

Термины "область, определяющая комплементарность" и "CDR", как применяют в настоящем описании, относятся к последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые придают специфичность к антигену и аффинность связывания. Как правило, существуют три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR могут быть определены с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включающих схемы, описанные Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Кэбат"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации "Чотиа"). Как применяют в настоящем описании, CDR, определенные согласно схеме номеров "Чотиа" также часто называют "гипервариабельные петли."

Например, по Кэбат, аминокислотные остатки CDR в переменной домене тяжелой цепи (VH) нумеруются 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в переменной домене легкой цепи (VL) нумеруются 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), и 89-97 (LCDR3). Согласно Чотиа, аминокислоты CDR в VH нумеруются 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в VL нумеруются 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Посредством объединения определений CDR по Кэбат и Чотиа, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в человеческой VH и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в человеческой VL.

В целом, если не указано конкретно, молекулы антител против PD-1 могут включать любую комбинацию из одной или нескольких CDR по Кэбат и/или гипервариабельных петель по Чотиа, *например*, описанную в Таблице 2. В одном варианте осуществления, следующие определения применяют для молекул антител против PD-1, описанных в Таблице 2: HCDR1 согласно объединенным определением CDR по обоим Кэбат и Чотиа, и HCCDR 2-3 и LCCDR 1-3 согласно определению CDR по Кэбат. По всем определениям, каждая VH и VL типовым образом включает три CDR и четыре FR, расположенные от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3, FR4.

В варианте осуществления, молекула антитела представляет собой молекулу моноспецифического антитела и связывается с единственным эпитопом. *Например*, молекула моноспецифического антитела, имеющая множество последовательностей

5 вариабельного домена иммуноглобулина, каждая из которых связывается с одним и тем же эпитопом.

В варианте осуществления молекула антитела представляет собой молекулу мультиспецифического антитела, *например*, она содержит множество последовательностей вариабельных доменов иммуноглобулина, где первая

10 последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, а вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, *например*, одном и том же белке (или одной и той же

15 субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, *например*, различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления молекула мультиспецифического антитела содержит

20 последовательность третьего, четвертого или пятого вариабельного домена иммуноглобулина. В варианте осуществления, молекула мультиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела, или молекулу тетраспецифического антитела.

В варианте осуществления молекула мультиспецифического антитела представляет

25 собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело имеет специфичность к не более чем двум антигенам. Молекула биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, который имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и второй

30 последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, который имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, *например*, одном и том же белке (или одной и той же субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы

35 находятся на различных антигенах, *например*, различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления молекула биспецифического антитела содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного

40 домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления молекула биспецифического антитела содержит половинное антитело, имеющее специфичность связывания для первого эпитопа, и половинное антитело, имеющее специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления молекула биспецифического антитела содержит половинное антитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и половинное антитело или его

45 фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления молекула биспецифического антитела содержит scFv или его фрагмент,

имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и scFv, или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления первый эпитоп расположен на PD-1, а второй эпитоп расположен на TIM-3, LAG-3, CEACAM (*например*, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), PD-L1 или PD-L2.

5 Гуманизированное или CDR-привитое антитело будет иметь по меньшей мере одну или две, но обычно все три реципиентных CDR (тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулина) замененных на донорную CDR. Антитело может быть заменено на по меньшей мере часть нечеловеческой CDR или только несколько из CDR могут быть заменены на нечеловеческие CDR. Необходимо только заменить количество CDR, 10 требуемых для связывания гуманизированного антитела с PD-1. Предпочтительно, донором будет антитело грызуна, *например*, крысиное или мышинное антитело, а реципиентом будет человеческий каркас или человеческий консенсусный каркас. Обычно, иммуноглобулин, обеспечивающий CDR, именуют "донором", а иммуноглобулин, обеспечивающий каркас именуют "акцептором". В одном варианте осуществления, 15 донорный иммуноглобулин не является человеческим (*например*, от грызунов). Акцепторный каркас является природным (*например*, человеческим) каркасом или консенсусным каркасом, или последовательностью на около 85% или выше, предпочтительно на 90%, 95%, 99% или выше идентичной с ним.

Как применяют в настоящем описании, термин "консенсусная последовательность" 20 относится к последовательности, образованной из наиболее часто встречающихся аминокислот (или нуклеотидов) в семействе родственных последовательностей. В семействе белков, каждое положение в консенсусной последовательности занято аминокислотой, встречающейся наиболее часто в этом положении в семействе. Если две аминокислоты встречаются в равной степени часто, обе могут быть включены в 25 консенсусную последовательность. "Консенсусный каркас" относится к каркасной области в консенсусной последовательности иммуноглобулина.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут включать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" антитела или части антитела согласно изобретению. "Терапевтически 30 эффективное количество" или "совместно терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному, при дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество модифицированного антитела или фрагмента антитела могут варьировать в соответствии с факторами, такими как состояние 35 заболевания, возраст, пол, и масса тела индивидуума, и способность антитела или части антитела вызывать желательный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или вредные воздействия модифицированного антитела или фрагмента антитела компенсируются терапевтически благоприятными эффектами. Терапевтически 40 эффективная дозировка раскрытой комбинации предпочтительно ингибирует измеряемый параметр, *например*, скорость роста опухоли по меньшей мере на около 20%, более предпочтительно по меньшей мере на около 40%, даже более предпочтительно по меньшей мере на около 60%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на около 80% относительно субъектов, не проходящих лечение. 45 Способность комбинаций, раскрытых в настоящем описании ингибировать измеряемый параметр, *например*, злокачественное новообразование, могут оцениваться в клиническом испытании и оцениваться квалифицированным практиком.

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному,

при дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическую дозу применяют у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Также в пределах объема изобретения находится набор, содержащий молекулу антитела против PD-1 и молекулу антитела против M-CSF, как описано в настоящем документе. Набор может включать один или более других элементов, включающих: инструкции по применению; другие реагенты, *например*, метку, терапевтическое средство, или средство, применимое для хелатообразования или иного сочетания антитела с меткой или терапевтическим средством, или радиопротекторную композицию; устройства или другие материалы для приготовления антитела для введения; фармацевтически приемлемые носители; и устройства или другие материалы для введения субъекту.

Список последовательностей

Заявка, рассматриваемая в данный момент, содержит Список Последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII, и полностью включен посредством ссылки в настоящее описание. Указанная копия ASCII, созданная 11 июля 2016 г., имеет название PAT057000_SL.txt и размер 55243 байтов.

Примеры антител-антагонистов макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF)

Различные формы M-CSF, как описано ниже, функционируют посредством связывания с его рецептором (M-CSFR) на целевых клетках. M-CSFR представляет собой трансмембранную молекулу с пятью внеклеточными иммуноглобулиноподобными доменами, трансмембранным доменом и внутриклеточным разомкнутым относящимся к Src доменом тирозинкиназы. M-CSFR кодируется протоонкогеном c-fms. Связывание M-CSF с внеклеточным доменом M-CSFR приводит к димеризации рецептора, которая активирует домен цитоплазматической киназы, приводя к аутофосфорилированию и фосфорилированию других клеточных белков (Hamilton J. A., J Leukoc Biol., 62(2):145-55 (1997); Hamilton J. A., Immuno Today., 18(7): 313-7(1997).

M-PHK непроцессированного человеческого M-CSF (также известного как колониестимулирующий фактор (CSF-1)) кодирует белок-предшественник из 554 аминокислот. Посредством альтернативного сплайсинга мПНК и дифференцированного посттрансляционного протеолитического процессинга, M-CSF может либо секретироваться в кровообращение в виде гликопротеина или хондроитинсульфата, содержащего протеогликан, или экспрессироваться в виде трансмембранного гликопротеина на поверхности M-CSF-продуцирующих клеток. Трехмерная структура бактериально экспрессированных аминоконцевых 150 аминокислот человеческого M-CSF, минимальной последовательности, требуемой для полной биологической активности *in vitro*, указывает на то, что этот белок является дисульфидно связанным димером, в котором каждый мономер состоит из четырех альфа-спиральных пучков и антипараллельного бета-листа (Pandit et al., Science 258: 1358-62 (1992)). Три отличающихся вида M-CSF продуцируются через альтернативный сплайсинг мПНК. Тремя полипептидными предшественниками являются M-CFS α из 256 аминокислот, M-CSF β из 554 аминокислот и M-CSF γ из 438 аминокислот. M-CSF β представляет собой секретируемый белок, который не встречается в мембраносвязанной форме. M-CSF α экспрессируется в виде интегрального мембранного белка, который медленно высвобождается под действием протеолитического расщепления. M-CSF α расщепляется

по аминокислотам 191-197. Мембраносвязанная форма М-CSF может взаимодействовать с рецепторами на близлежащих клетках и, следовательно, опосредует специфические контакты между клетками. Термин "М-CSF" может также включать аминокислоты 36-438.

5 Были описаны антагонисты М-CSF. Антагонист М-CSF из комбинации может представлять собой малую молекулу, антитело или другой антигенсвязывающий белок, малую молекулу, нуклеиновую кислоту (такую как мРНК), или любую другую такую молекулу, которая препятствует активации и функции М-CSF.

В одном примере, антагонистом М-CSF является молекула антитела против М-CSF. 10 Антитела против М-CSF, которые могут быть применимыми в настоящем изобретении, включают такие антитела против М-CSF, раскрытые в публикации Международной патентной заявки № WO 2005/068503, которая полностью раскрыта в настоящем описании посредством ссылки по причине описания антител против М-CSF. WO 2005/068503 раскрывает, например, антитела, которые связываются с такими же самыми 15 эпитопами, что и антитела RX1, 5H4, MC1 и/или MC3, фармацевтические готовые формы, включающие специфические антитела против М-CSF, сконструированные с учетом требований эргономики™ версии вышеуказанных антител и способы получения фармацевтических лекарственных форм. Термин "антитело" применяется в самом широком смысле и включает полностью собранные антитела, моноклональные антитела, 20 поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антител, которые могут связываться с антигеном (например, Fab', F'(ab)2, Fv, одноцепочечные антитела, диатела), и рекомбинантные пептиды, содержащие приведенные выше, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность.

25 Другие антитела против М-CSF, которые могут быть применимыми в настоящем изобретении, включают такие антитела против М-CSF, раскрытые в международных публикациях № WO 2003/028752, US2009117103 и US2005059113, каждая из которых полностью раскрыта в настоящем описании посредством ссылки по причине описания молекул антител против М-CSF.

30 В одном варианте осуществления, молекула антитела, применимая в способах согласно изобретению, включает молекулу антитела, которая связывается с линейным эпитопом, представленным RFRDNTPN (SEQ ID NO: 42) или RFRDNTAN (SEQ ID NO: 43). Такое антитело является сконструированным с учетом требований эргономики антителом RX1 (H-RX1), раскрытым в WO 2005/068503. В одном другом варианте 35 осуществления, антитело может являться молекулой антитела, которое связывается с линейным эпитопом, представленным ITFEFVDQE (SEQ ID NO: 44). Таким антителом является 5H4, раскрытое в WO 2005/068503.

В одном варианте осуществления, H-RX1 применяют в комбинации согласно изобретению. Тяжелые и легкие константные, переменные области, и области, 40 определяющие комплементарность (CDR), антитела H-RX1 или его антигенсвязывающего фрагмента показаны в Таблице 1.

Таблица 1. H-RX1, антитело против М-CSF

45 (H-RX1) Белок производный от HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDYSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISYSGSTSYNPSLK SRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSGFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)
------------------------------------	---

5	(H-RX1) Белок производный от LC	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIHWHYQQKTDQAPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTSSVEAEDAADYCYCQINSWPTTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)
	CDR1 Тяжелой Цепи (Кэбат)	SDYAWN (SEQ ID NO: 3)
	CDR2 Тяжелой Цепи (Кэбат)	YISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 4)
	CDR3 Тяжелой Цепи (Кэбат)	FDYAHAMDY (SEQ ID NO: 5)
	CDR1 Легкой Цепи (Кэбат)	QASQSIGTSIH (SEQ ID NO: 6)
	CDR2 Легкой Цепи (Кэбат)	YASESIS (SEQ ID NO: 7)
	CDR3 Легкой Цепи (Кэбат)	QQINSWPTT (SEQ ID NO: 8)
10	(H-RX1) Белок, производный от HC (включаяющ. лидерный пептид)	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDYSITSYAWNIRQFPGKGL EWMGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)
15	(H-RX1) Белок производный от LC (включаяющ. лидерный пептид)	MVSTPQFLVFLFWIPASRGDIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIHWHYQQKTDQAPKLLIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTSSVEAEDAADYCYCQINSWPTTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHN KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10)

В одном варианте осуществления, антитело-антагонист М-CSF представляет собой молекулу гуманизированного антитела, имеющего последовательность вариательной области тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и последовательность вариательной области легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2. В одном другом варианте осуществления, молекула антитела содержит вариательную область тяжелой цепи, которая содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3; и вариательную область легкой цепи, которая содержит домены CDR1, CDR2, и CDR3, где вариательная область CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5; а вариательная область CDR3 легкой цепи содержит аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:8; и, где антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с М-CSF с аффинностью связывания, равной около 10^{-7} М. Антитело или его фрагмент могут дополнительно включать вариательную область CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID No:4; и вариательную область CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7. Антитело или его фрагмент могут дополнительно включать вариательную область CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3; и вариательную область CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6.

В еще одном другом примере, гуманизированное антитело или сконструированное с учетом требований эргономики антитело или его фрагмент применимые в способах изобретения, связываются с человеческим М-CSF, где указанное антитело связывается с эпитопом М-CSF, который содержит по меньшей мере 4 смежных остатка RFRDNTPN (SEQ ID NO: 42) или RFRDNTAN (SEQ ID NO: 43), где указанное антитело имеет Kd аффинности (константу равновесия при диссоциации) по отношению к человеческому М-CSF, равную по меньшей мере 10^{-7} М, где указанное антитело содержит все три CDR тяжелой цепи, как установлено выше.

Антитела, раскрытые в настоящем описании, могут представлять собой производные одноцепочечных антител, диател, доменных антител, нанотел и унител. Например, изобретение предоставляет изолированное моноклональное антитело (или его функциональный фрагмент), содержащее вариательную область тяжелой цепи и

вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% является идентичной с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 1; вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% является идентичной с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO:2; антитело связывается с М-CSF (*например*, человеческим и/или обезьяньим М-CSF) и нейтрализует сигнальную активность М-CSF при сравнении с вариабельными областями, отображенными в последовательности, описанной выше.

В других вариантах осуществления, аминокислотные последовательности вариабельной тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной легкой цепи (VL) могут быть на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными с последовательностями, приведенными в Таблице 1 выше.

В некоторых вариантах осуществления, антитело согласно изобретению, имеет вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или несколько из этих последовательностей CDR имеют установленные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем документе, или их консервативных модификаций, и, где антитела сохраняют желательные функциональные свойства М-CSF-связывающих антител, описанные в Таблице 1.

Соответственно, изобретение предоставляет изолированное моноклональное антитело против М-CSF или его фрагмент, состоящие из вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где: аминокислотная последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 3, и ее консервативные модификации; аминокислотная последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 4 и ее консервативные модификации; аминокислотная последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 5 и ее консервативные модификации; аминокислотная последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи включает SEQ ID NO: 6 и ее консервативные модификации; аминокислотная последовательность CDR2 вариабельной области легкой цепи включает SEQ ID NO: 7 и ее консервативные модификации; аминокислотная последовательность CDR3 вариабельной области легкой цепи включает SEQ ID NO: 8 и ее консервативные модификации; молекула антитела специфически связывается с М-CSF, и нейтрализует активность М-CSF.

Антитела, применяемые в изобретении, могут представлять собой фрагмент антитела, которое связывается с М-CSF, выбранный из группы, состоящей из; Fab, F(ab₂)', F(ab)₂', scFv, VHH, VH, VL, dAbs. Способы получения антител против М-CSF описаны в WO 2005/068503.

Примеры антитела-антагониста PD-1

Молекулы PD-1, применимые в настоящем изобретении, могут представлять собой любые антагонисты PD-1. В одном примере, молекула антагониста PD-1, такая как молекула антитела против PD-1, может ингибировать, снижать или нейтрализовать одну или более активностей PD-1, что приводит к блокаде или снижению контрольной точки иммунного ответа. В одном варианте осуществления, молекула антагониста PD-1, такого как антитело против PD-1, приводит к одному или нескольким из: увеличения

Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, увеличения опосредованной рецепторами Т-клеток пролиферации, снижения иммунной эвазии злокачественными клетками, восстановления функции эффекторных клеток (*например*, одной или нескольких из пролиферации Т-клеток, секреции IFN-альфа или цитолитической функции),

ингибирования функции регуляторных Т-клеток или воздействия на активность множества клеточных типов, таких как регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки и NK-клетки).

Молекулы PD-1, применимые в настоящем изобретении, показаны в Таблице 1, и описаны в публикации РСТ РСТ/US2015/012754, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

В одном варианте осуществления, молекула антитела против PD-1 представляет собой гуманизированное антитело против PD-1 и включает вариабельный домен тяжелой цепи и константную область, вариабельный домен легкой цепи и константную область или обе из них, содержащие аминокислотную последовательность из ВАР049-Клона-В или ВАР049-Клона-Е, как описано в Таблице 2, или кодируемые нуклеотидной последовательностью в Таблице 2. Молекула антитела против PD-1, необязательно, содержит лидерную последовательность из тяжелой цепи, легкой цепи или обеих, как показано в Таблице 3; или последовательность, идентичную с ней по существу.

В еще одном другом варианте осуществления, молекула антитела против PD-1 включает по меньшей мере одну, две, или три области, определяющих комплементарность (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, *например*, антитела, выбранного из любого из ВАР049-Клона-В или ВАР049-Клона-Е, как описано в Таблице 2, или кодируемого нуклеотидной последовательностью в Таблице 2.

В варианте осуществления, *например*, варианте осуществления, содержащем вариабельную область, CDR (*например*, CDR по Чотиа или CDR по Кэбат), или другую последовательность, на которую ссылаются в настоящем описании, *например*, в Таблице 2, молекула антитела является молекулой моноспецифического антитела, молекулой биспецифического антитела или представляет собой молекулу антитела, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела, *например*, половинное антитело или антигенсвязывающий фрагмент половинного антитела.

Таблица 2: Тяжелая цепь и легкая цепь, CDR и тяжелая цепь и вариабельные домены легкой цепи антитела против PD-1

ВАР049-Клон-В		
SEQ ID NO: 11	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVR QATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTITVTV SS
SEQ ID NO: 12	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLDSGNQKNFLT YQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFFTIS SLQPEDIATYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIK
SEQ ID NO: 13 (Кэбат)	HCDR1	TYWMH
SEQ ID NO: 14 (Кэбат)	HCDR2	NIYPGTGGSNFDEKFKN
SEQ ID NO: 15 (Кэбат)	HCDR3	WTTGTGAY
SEQ ID NO: 16 (Кэбат)	LCDR1	KSSQSLDSGNQKNFLT
SEQ ID NO: 17 (Кэбат)	LCDR2	WASTRES
SEQ ID NO: 18 (Кэбат)	LCDR3	QNDYSYPYT
SEQ ID NO: 19	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVR QATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTITVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYV

5			DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHY TQKLSLSLGL
	SEQ ID NO: 20	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCCKSSQSLDSDGNQKNFLT YQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIAITYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	BAP049-Клон-Е HC		
10	SEQ ID NO: 21 (Кэбат)	HCDR1	TYWMH
	SEQ ID NO: 22 (Кэбат)	HCDR2	NIYPGTGGSNFDEKFN
	SEQ ID NO: 23 (Кэбат)	HCDR3	WTTGTGAY
15	SEQ ID NO: 24	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVR QATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFNRTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTITVTV SS
	SEQ ID NO: 25	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVR QATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFNRTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTITVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHY TQKLSLSLGL
	BAP049-Клон-Е LC		
20	SEQ ID NO: 26 (Кэбат)	LCDR1	KSSQSLDSDGNQKNFLT
	SEQ ID NO: 27 (Кэбат)	LCDR2	WASTRES
	SEQ ID NO: 28 (Кэбат)	LCDR3	QNDYSYPYT
25	SEQ ID NO: 29	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCCKSSQSLDSDGNQKNFLT YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFGSGSGTDFTFTIS SLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIK
	SEQ ID NO: 30	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCCKSSQSLDSDGNQKNFLT YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFGSGSGTDFTFTIS SLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 3. Аминокислотные последовательности лидерных последовательностей тяжелой и легкой цепи для гуманизированных mAb BAP049-Клона-В и BAP049-Клона-Е

	BAP049-Клон-В SEQ ID NO: 31	HC	MAWVWTLPLMAAAQSVQA
35	SEQ ID NO: 32	LC	MSVLTQVLALLLWLTGTRC
	BAP049-Клон-Е SEQ ID NO: 33	HC	MAWVWTLPLMAAAQSVQA
	SEQ ID NO: 34	LC	MSVLTQVLALLLWLTGTRC

Таблица 4. Аминокислотные последовательности константной области тяжелых цепей человеческого IgG и человеческой каппа легкой цепи

45	HC SEQ ID NO: 35	аминокислотная последовательность мутантной константной области IgG4 (S228P) (EU-Нумерация) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVEKYGPCCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	LC SEQ ID NO: 36	Аминокислотная последовательность константной области каппа-цепи человека RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	HC SEQ ID NO: 37	аминокислотная последовательность мутантной константной области, связывающая C-концевой лизин (K) IgG4 (S228P) (EU-Нумерация) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

		VPSSSLGKTK YTCNVDPHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPKPKD LMSIRTPVET CVVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSLG
5	HC SEQ ID NO: 38	IgG1 дикого типа ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRT EVTCTVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
10	HC SEQ ID NO: 39	аминокислотная последовательность мутантной константной области IgG1 (N297A) (EU-Нумерация) ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRT EVTCTVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYA STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
15	HC SEQ ID NO: 40	аминокислотная последовательность мутантной константной области IgG1 (D265A, P329A) (EU-Нумерация) ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRT EVTCTVVVAVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
	HC SEQ ID NO: 41	аминокислотная последовательность мутантной константной области IgG1 (L234A, L235A) (EU-Нумерация) ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAEAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRT EVTCTVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Генерация гуманизированных ВАР049-Клона-В и ВАР049-Клона Е и их характеристика

Мышиное моноклональное антитело ВАР049 против PD-1 было гуманизировано. Были получены последовательности и образцы для тестирования от шестнадцати клонов гуманизированного ВАР049 с уникальными последовательностями их варибельной области. Эти клоны дополнительно анализировали на предмет их биологических функций (*например*, связывания с антигеном и блокирования лиганда), структурных признаков и транзientной экспрессии в клетках CHO.

Аффинность связывания и специфичность

Связывание иллюстративного гуманизированного антитела против PD-1 на человеческом белке PD-1 измеряли методом Biacore. Результаты представляют собой: $K_a=2,78 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $K_d=2,13 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$; $K_D=0,0827 \pm 0,005505 \text{ нМ}$.

Технология и способ гуманизации

Гуманизацию ВАР049 выполняли, используя комбинаторную библиотеку человеческих эмбриональных каркасов варибельной области (FW). Технология предусматривает перенос мышиных CDR в рамке считывания в библиотеку человеческих варибельных областей (VR), которые были построены посредством статистического комбинирования последовательностей FW1, FW2 и FW3 человеческой эмбриональной линии. Применяли только одну последовательность FW4, которая представляет собой WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 45) для тяжелой цепи (HC) (подгруппа I человеческой HC по Кэбат) и FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 46) для легкой цепи (LC) (подгруппа I человеческой к по Кэбат). Библиотеку последовательностей VR гибридизировали с последовательностями человеческой константной области (CR), человеческой IgG4 (S228P) из HC и человеческой к CR из LC, и полученную в результате библиотеку целого IgG экспрессировали в клетках CHO для скрининга. Скрининг выполняли с супернатантами культуры ткани, измеряя avidность связывания на антиген-экспрессирующих клетках методом ELISA в полноклеточном формате или на FACS.

Способ гуманизации выполняли постадийным образом, начиная с построения и

экспрессии соответствующего химерного mAb (мышиная VR, IgG4(S228P), человеческая к), которое может служить в качестве компаратора для скрининга гуманизированных клонов. Гуманизацию VR из LC и HC выполняли на двух независимых стадиях.

Библиотеку гуманизированной LC (huLC) спаривали с химерной HC (мышиная VR, IgG4(S228P)) и полученные в результате "гуманизированные наполовину" mAb подвергали скринингу на связывание активностью посредством ELISA. Отбирали huLC от клонов с адекватной активностью связывания ($\geq$ связывания химерного mAb). Аналогично, библиотеку гуманизированной HC (huHC) спаривали с химерной LC (мышиная VR, человеческая к) и подвергали скринингу на активность связывания посредством ELISA. Отбирали huHC от клонов с соответствующей активностью связывания ($\geq$ связывания химерного mAb).

Вариабельные области отобранных huLC и huHC затем секвенировали, чтобы идентифицировать huLC и huHC с уникальными последовательностями (несколько клонов от первоначального процесса селекции могут иметь общие LC или HC). Уникальные huLC и huHC затем статистически комбинировали для образования небольшой библиотеки гуманизированных mAb (humAbs), которые экспрессировали в клетках CHO и подвергали скринингу на антиген-экспрессирующих клетках в формате ELISA и FACS. Клоны с активностями связывания, которые были равны связыванию или были лучше связывания химерного компаратора mAb представляют собой конечный продукт способа гуманизации.

Построение химерного антитела

Получали три варианта химерного антитела, которые имели остаток либо Cys, Tyr или Ser в положении 102 последовательности LC. Три химерных антитела, т.е., BAP049-chi (Cys), BAP049-chi (Tyr) и BAP049-chi (Ser) (также известные как BAP049-chi, BAP049-chi-Y, и BAP049-chi-S, соответственно), экспрессировали в клетках CHO и тестировали по их способности конкурировать с меченым мышинным антителом за связывание с PD-1-экспрессирующими клетками Юркат. Три варианта были неразличимыми в эксперименте по конкурентности. Результаты показывают, что три химерных mAb (Cys, Tyr, Ser) конкурируют в равной степени хорошо со связыванием меченого мышинного mAb BAP049. Небольшое различие между кривыми для химерного mAb и кривой мышинного mAb обусловлено вероятно различными методами, применяемыми для определения концентраций mAb. Концентрацию мышинного mAb определяли по измерению OD280, в то время как концентрации химерного mAb в супернатантах определяли с использованием ELISA, используя стандартный IgG4. Остаток эмбрионального Tyr был отобран для гуманизированного антитела.

Клоны гуманизированного антитела

Способ гуманизации дал на выходе шестнадцать клонов с аффинностями связывания, сравнимыми с аффинностью связывания химерного антитела. Дополнительно к данным по связыванию, для каждого клона, были предоставлены последовательности VR наряду с образцом mAb. Образцы были получены посредством транзientных трансфекций клеток CHO, и супернатанты культуры ткани были концентрированы. Концентрации антитела в растворах определяли посредством IgG4-специфичного ELISA.

Шестнадцать уникальных клонов представляют собой комбинации четырех уникальных последовательностей HC и девяти уникальных последовательностей LC. Для областей HC FW, последовательности HC являются комбинациями последовательностей одной из двух различных VHFW1, одной из трех различных VHFW2 и одной из двух различных VHFW3. Для областей LC FW, последовательности LC являются комбинациями последовательностей одной из пяти различных VLFW1, одной

из трех различных VLFW2, и одной из четырех различных VLFW3. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи для клонов В и Е гуманизированного ВАР049 показаны в Таблице 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности CDR тяжелой и легкой цепи клонов

5 гуманизированного ВАР049 также показаны в Таблице 2.

Селекция гуманизированных клонов

Отобранные клоны, включающие клоны В и Е, дополнительно тестировали на предмет их способности блокировать связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 и усиления активности Т-клеток в аналитических тестах *in vitro* с человеческими РВМС.

10 Экспрессия гуманизированного антитела против PD-1, ВАР049

Пять гуманизированных клонов были отобраны для оценки экспрессии в клетках яичника китайского хомяка (CHO).

Векторы единичного гена (SGV) были построены с использованием GS Xseed векторов Лонцы (IgG4proΔk для тяжелой цепи и Каппа для легкой цепи). SGV амплифицировали и транзientно совместно трансфицировали в клетки CHOK1SV GS-KO для экспрессии

15 в объеме 2,8 л.

Культуры экспрессии собирали в День 6 после трансфекции и осветляли центрифугированием и стерилизующей фильтрацией. Осветленный супернатант культур клеток очищали, используя одностадийную хроматографию с Белком А. Анализ качества

20 продукта в виде SE-ВЭЖХ, SDS-PAGE, IEF и LAL проводили, используя очищенное вещество при концентрации, равной 1 мг/мл, включая антитело в качестве контрольного образца.

Построение вектора

Последовательности областей, кодирующих переменный домен легкой и тяжелой цепи, синтезировали в GeneArt AG. Области, кодирующие переменный домен легкой цепи, субклонировали в рХС-Каппа, а области, кодирующие переменный домен тяжелой цепи, субклонировали в векторы рХС-IgG4pro ΔK, соответственно, используя N-концевой сайт рестрикции Hind III и C-концевые сайты рестрикции BsiWI (легкая цепь) и ApaI (тяжелая цепь). Позитивные клоны подвергали скринингу посредством ПЦР-

Амплификация ДНК

35 Одиночную бактериальную колонию пикировали в 15 мл среды Лурия-Бертани (LB) (LB Broth, Sigma-Aldrich, L7275), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при 37°C в течение ночи при встряхивании при 220 об/мин. Полученную стартовую культуру применяли для инокуляции 1 л среды Лурия-Бертани (LB), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при 37°C в течение ночи при встряхивании при

Культура клеток CHOK1SV GS-KO

40 220 об/мин. ДНК вектора изолировали, используя систему QIAGEN Plasmid Plus Gigaprep (QIAGEN, 12991). Во всех случаях, концентрацию ДНК измеряли, используя спектрофотометр Nanodrop 1000 (Thermo-Scientific), и доводили до 1 мг/мл буфером EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Качество ДНК для векторов единичного гена оценивали посредством измерения отношения поглощения A260/A280. Было установлено, что оно

45 составляет между 1,88 и 1,90.

встряхивателе-инкубаторе при 36,5°C, 5% CO₂, 85% влажности, 140 об/мин. Клетки обычным образом субкультивировали каждые 3-4 дня, засеая при 2×10^5 клеток/мл, и размножали, чтобы иметь достаточно клеток, доступных для трансфекции. Клетки удаляли после 20 пассирования.

Транзиентные трансфекции клеток CHOK1SV GS-KO

Транзиентные трансфекции выполняли, используя клетки CHOK1SV GS-KO, которые находились в культуре минимально две недели. Клетки субкультивировали за 24 ч до трансфекции, и жизнеспособность клеток составляла >99% во время трансфекции.

Все трансфекции выполняли посредством электропорации, используя Gene Pulse MXCell (Bio-Rad), систему на основе планшета для электропорации. Для каждой трансфекции, жизнеспособные клетки ресуспендировали в предварительно нагретой среде до $2,86 \times 10^7$ клеток/мл. 80 мкг ДНК (отношение 1:1 тяжелой и легкой цепи SGV) и 700 мкл клеточной суспензии, распределяли аликвотами в каждую кювету/лунку.

Клетки электропорировали при 300 В, 1300 мкФ. Трансфицированные клетки переносили в предварительно нагретую среду в колбах Эрленмейера и кювету/лунку споласкивали дважды предварительно нагретой средой, которую также переносили в колбы.

Трансфицированные клеточные культуры инкубировали во встряхивателе-инкубаторе при 36,5°C, 5% CO₂, 85% влажности, 140 об/мин. в течение 6 дней. Жизнеспособность

клеток и концентрации жизнеспособных клеток измеряли во время сбора, используя автоматизированный цитометр Cedex HiRes (Roche).

Характеризация аффинности связывания и специфичности гуманизированного антитела против PD-1

Связывание иллюстративного гуманизированного антитела против PD-1, включая Клон В и Клон Е, как показано в Таблице 2 на белке человеческого PD-1, измеряли, используя метод Biacore. Результаты представляют собой: $K_a = 2,78 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 2,13 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_D = 0,0827 \pm 0,005505 \text{ нМ}$.

Связывание одного и того же гуманизированного антитела против PD-1 на человеческих PD-1-экспрессирующих клетках 30019 измеряли, используя анализ FACS. Результат показывает, что антитело против PD-1 (человеческий IgG4) связывается с высокой аффинностью с человеческим PD-1 по сравнению с изотипическим контролем человеческого IgG4.

Было обнаружено, что иллюстративное гуманизированное антитело против PD-1 проявляет высокую аффинность к белку PD-1 макаки и экспрессирующим PD-1 макаки клеткам 30019. По данным измерений методом Biacore, антитело против PD-1 связывается с PD-1 макаки с K_D , равным $0,093 \pm 0,015 \text{ нМ}$. Аффинность связывания с PD-1 макаки является сравнимой с его аффинностью связывания с человеческим PD-1.

Дополнительные анализы связывания показывают, что иллюстративное гуманизированное антитело против PD-1 не является перекрестно реагирующим с мышинным PD-1 или перекрестно реагирующим с родительской клеточной линией.

Блокирование взаимодействий между PD-1 и его лигандами

Исследовали способность иллюстративного гуманизированного антитела против PD-1 блокировать взаимодействия между PD-1 и обоими его известными лигандами, PD-L1 и PD-L2. результаты показывают, что антитело против PD-1 блокировало связывание PD-L1 и PD-L2 на человеческих PD-1-экспрессирующих клетках 30019 в сравнении с контрольным изотипом человеческого IgG4 и контролем без антитела. Антитело против PD-1 блокировало связывание PD-L1 на клетках 30019 с IC₅₀, равным

0,94±0,15 нМ. Такое же антитело блокировало связывание PD-L2 на клетках 30019 с IC50, равным 1,3±0,25 нМ.

Биологическая активность и функция антитела против PD-1

В других вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела способны к связыванию с человеческим PD-1 с константой диссоциации (K_D) менее около 0,2 нМ.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с человеческим PD-1 с K_D менее около 0,2 нМ, 0,15 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,02 нМ, *например*, от около 0,13 нМ до 0,03 нМ, *например*, от около 0,077 нМ до 0,088 нМ, *например*, около 0,083 нМ, *например*, измеренной методом Biacore.

В других вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с PD-1 макаки с K_D менее около 0,2 нМ, 0,15 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,02 нМ, *например*, от около 0,11 нМ до 0,08 нМ, *например*, около 0,093 нМ, *например*, измеренной методом Biacore.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с обоими человеческим PD-1 и PD-1 макаки с аналогичной K_D , *например*, в интервале нМ, *например*, измеренной методом Biacore. В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с человеческим гибридным белком PD-1-Ig с K_D менее около 0,1 нМ, 0,075 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ или 0,01 нМ, *например*, около 0,04 нМ, *например*, измеренной ELISA.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с клетками Юркат, которые экспрессируют человеческий PD-1 (*например*, человеческий PD-1-трансфицированный с клетками Юркат) с K_D менее около 0,1 нМ, 0,075 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, или 0,01 нМ, *например*, около 0,06 нМ, *например*, измеренной анализом FACS.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с Т-клетками макаки с K_D менее около 1нМ, 0,75 нМ, 0,5 нМ, 0,25 нМ, или 0,1 нМ, *например*, около 0,4 нМ, *например*, измеренной анализом FACS.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с клетками, которые экспрессируют PD-1 макаки (*например*, клетками, трансфицированными с PD-1 макаки) с K_D менее около 1нМ, 0,75 нМ, 0,5 нМ, 0,25 нМ, или 0,01 нМ, *например*, около 0,6 нМ, *например*, измеренной анализом FACS.

В других вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела способны снижать связывание PD-1 с PD-L1, PD-L2 или обоими, или с клеткой, которая экспрессирует PD-L1, PD-L2 или оба. В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела снижают (*например*, блокируют) связывание PD-L1 с клеткой, которая экспрессирует PD-1 (*например*, клетками 30019, экспрессирующими человеческий PD-1) с IC50 менее около 1,5 нМ, 1 нМ, 0,8 нМ, 0,6 нМ, 0,4 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ, *например*, между около 0,79 нМ и около 1,09 нМ, *например*, около 0,94 нМ или около 0,78 нМ или менее, *например*, около 0,3 нМ. В нескольких вариантах осуществления, вышеуказанные антитела снижают (*например*, блокируют) связывание PD-L2 с клеткой, которая экспрессирует PD-1 (*например*, человеческими PD-1-экспрессирующими клетками 30019) с IC50 менее около 2 нМ, 1,5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ или 0,2 нМ, *например*, между около 1,05 нМ и около 1,55 нМ или около 1,3 нМ или менее, *например*, около 0,9 нМ.

В других вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела способны к усилению антиген-специфичного Т-клеточного ответа.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела увеличивают экспрессию IL-2 из клеток, активированных энтеротоксином В стафилококков (SEB) (*например*, при 25 мкг/мл) по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5-кратно, *например*, приблизительно 2-3-кратно, *например*, приблизительно 2-2,6-кратно, *например*, приблизительно 2,3-кратно, по сравнению с экспрессией IL-2, когда применяют изотипический контроль (*например*, IgG4), *например*, измеренную в аналитическом тесте на активацию Т-клеток SEB или тесте *ex vivo* с человеческой цельной кровью.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела увеличивают экспрессию IFN- γ из Т-клеток, стимулированных антисывороткой против CD3 (*например*, при 0,1 мкг/мл) по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5-кратно, *например*, приблизительно 1,2-3,4-кратно, *например*, приблизительно 2,3-кратно, по сравнению с экспрессией IFN- γ , когда применяют изотипический контроль (*например*, IgG4), *например*, измеренную в аналитическом тесте на активность IFN- γ .

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела увеличивают экспрессию IFN- γ из Т-клеток, активированных SEB (*например*, при 3 пг/мл) по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5-кратно, *например*, приблизительно 0,5-4,5-кратно, *например*, приблизительно 2,5-кратно, по сравнению с экспрессией IFN- γ , когда применяют изотипический контроль (*например*, IgG4), *например*, измеренную в аналитическом тесте на активность IFN- γ .

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела увеличивают экспрессию IFN- γ из Т-клеток, активированных пептидом CMV по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5-кратно, *например*, приблизительно 2-3,6-кратно, *например*, приблизительно 2,8-кратно, по сравнению с экспрессией IFN- γ , когда применяют изотипический контроль (*например*, IgG4), *например*, измеренную в аналитическом тесте на активность IFN- γ .

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела увеличивают пролиферацию Т-клеток CD8⁺, активированных пептидом CMV по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5-кратно, *например*, приблизительно 1,5-кратно, по сравнению с пролиферацией Т-клеток CD8⁺, когда применяют изотипический контроль (*например*, IgG4), *например*, измеренную по процентной доле Т-клеток CD8⁺, которые проходят через по меньшей мере n (*например*, $n=2$ или 4) делений клеток.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела имеют Стах между приблизительно 100 мкг/мл и приблизительно 500 мкг/мл, между приблизительно 150 мкг/мл и приблизительно 450 мкг/мл, между приблизительно 250 мкг/мл и приблизительно 350 мкг/мл, или между приблизительно 200 мкг/мл и приблизительно 400 мкг/мл, *например*, приблизительно 292,5 мкг/мл, *например*, измеренную у обезьян.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела имеют $T_{1/2}$ между приблизительно 250 часами и приблизительно 650 часами, между приблизительно 300 часами и приблизительно 600 часами, между приблизительно 350 часами и приблизительно 550 часами или между приблизительно 400 часами и приблизительно 500 часами, *например*, приблизительно 465,5 часами, *например*, измеренное у обезьян.

В нескольких вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с PD-1 с Kd медленнее 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} или 1×10^{-5} с⁻¹, *например*, приблизительно $2,13 \times 10^{-4}$ с⁻¹, *например*, измеренной методом Biacore. В нескольких

вариантах осуществления, молекулы вышеуказанного антитела связываются с PD-1 с Ка быстрее 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , или $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, *например*, приблизительно $2,78 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, *например*, измеренной методом Biacore.

Дополнительные партнеры комбинации

Партнеры комбинации антитела против PD-1 и антитела против M-CSF в любом варианте осуществления предпочтительно составляют или применяют, чтобы они были совместно терапевтически активными. Это означает, в частности, что имеется по меньшей мере один благоприятный эффект, например взаимное усиление эффекта партнеров комбинации, в частности, например, синергизм, более чем аддитивный эффект, дополнительные преимущественные эффекты (например, дополнительный терапевтический эффект, не обнаруженный для любого из одиночных антител), меньше побочных эффектов и/или комбинированный терапевтический эффект при дозировке, неэффективной для одного или обоих партнеров комбинации. Например, термин "совместно (терапевтически) активные" может означать, что соединения могут даваться раздельно или последовательно (в хронологически разделенном шахматном порядке, особенно специфичном к последовательности) в таких временных интервалах, что они, предпочтительно, у теплокровного животного, особенно, человека, подлежащего лечению, все еще показывают (предпочтительно усиленное, более аддитивного, или синергестическое) взаимодействие (совместный терапевтический эффект). Совместный терапевтический эффект может, среди прочего, определяться по снижению объема опухоли или уменьшению симптомов и, как описано ниже.

В одном аспекте, изобретение относится к лечению субъекта *in vivo* с использованием комбинации молекул антитела против PD-1 и молекул антитела против M-CSF, таким образом, что рост злокачественных опухолей, как описано в настоящем документе, ингибируется или снижается. Комбинация антитела против PD-1 и молекул антитела против M-CSF может применяться по отдельности, чтобы ингибировать рост злокачественных опухолей или может применяться в комбинации с одним или несколькими из: стандартного лечения (*например*, злокачественных новообразований), одного другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, иммуномодулятора (*например*, активатора костимулирующей молекулы или ингибитора ингибирующей молекулы); или вакцины, *например*, терапевтической противораковой вакцины других форм клеточной иммунотерапии.

В одном примере, комбинация, описанная в настоящем документе может применяться для лечения рака молочной железы, такого как позитивный к эндокринному рецептору (рецептору эстрогена или прогестерона), HER2-позитивный, трижды негативный (непозитивный к рецепторам для эстрогена, прогестерона или HER2) или трижды позитивный (позитивный для эстрогенных рецепторов, прогестероновых рецепторов и HER2). Субъекты со злокачественным новообразованием, получающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии (будет зависеть от стадии рака молочной железы) или пациентами, проходящими лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, не получавших еще никакого лечения. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих прогрессирующий трижды негативный рак молочной железы, которые проходили лечение или которые получают стандартную терапию, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения меланомы. Субъекты со злокачественным новообразованием, получающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение

или проходят лечение с использованием стандартной терапии (например, карбоплатин с паклитакселом или Карбоплатин/Гемцитабин или паклитаксел) или являются резистентными или рефрактерными к другим иммуномодуляторным ингибиторам контрольных точек иммунного ответа (например, PD-1 или PD-L1), или пациентами, не получавших еще никакого лечения. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих меланому, которые проходили лечение с использованием PD-1 или PD-L1, и которые являются резистентными или рефрактерными к такому лечению, или которые получают стандартное лечение, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения рака яичника. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение или проходят лечение с использованием стандартной терапии (например, карбоплатином с паклитакселом или Карбоплатином/Гемцитабином или паклитакселом), или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих прогрессирующий рак яичника, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии или получают стандартное лечение, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения рака поджелудочной железы. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами с раком поджелудочной железы, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии (например, гемцитабином), или проходят лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих прогрессирующий рак поджелудочной железы, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, или которые получают стандартное лечение, но показывают прогрессирование заболевания. Комбинация, описанная в настоящем документе, может вводиться пациентам, которые получают стандартное лечение, или которые получали стандартное лечение.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения глиобластомы. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии, или проходят лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих глиобластому, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения рака легких, такого как немелкоклеточный рак легких (NSCLC), аденокарцинома легкого или плоскоклеточный рак легких. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами с раком легких, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии (например, карбоплатином/гемцитабином или паклитакселом), или проходят лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в

настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих рак легких, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения почечно-клеточной карциномы. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии, или проходят лечение с использованием стандартной терапии или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих почечно-клеточную карциному, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии, или проходят лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих диффузную В-крупноклеточную лимфому, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения мезотелиомы. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение с использованием стандартной терапии, или проходят лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих мезотелиому, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, но показывают прогрессирование заболевания.

В одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения назофарингеальной карциномы. Субъекты со злокачественным новообразованием, принимающие комбинацию, могут быть пациентами, которые прежде проходили лечение или проходят лечение с использованием стандартной терапии, или пациентами, которые еще не получали какой-либо терапии. В одном примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих назофарингеальную карциному, которые проходили лечение с использованием стандартной терапии, но показывают прогрессирование заболевания.

В еще одном другом примере, комбинация, описанная в настоящем документе, может применяться для лечения злокачественного новообразования, которое является резистентным или рефрактерным к иммуномодулятору, такому как ингибитор молекулы контрольной точки иммунного ответа. В одном варианте осуществления, иммуномодулятор представляет собой ингибитор PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и/или TGFR бета. В одном другом примере иммуномодулятор является антителом против PD-1 или против PD-L1. В этом примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих прогрессирующий трижды негативный рак молочной железы, которые прежде проходили лечение с использованием антитела против PD-1 или против

PDL1, но показывают прогрессирование заболевания. В одном другом примере, комбинацию, описанную в настоящем документе, применяют для лечения пациентов, имеющих меланому, которые прежде проходили лечение с использованием антитела против PD-1 или против PDL1, но показывают прогрессирование заболевания.

5 Таким образом, комбинация согласно изобретению предоставляет способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающего введение субъекту терапевтически эффективного количества комбинации, описанной в настоящем документе. В одном другом варианте осуществления, комбинация согласно изобретению может вводиться по отдельности или в комбинации с одним или несколькими другими
10 средствами, и комбинация может вводиться в любом порядке или одновременно. В одном примере, комбинационная терапия, раскрытая в настоящем описании, может включать композицию согласно настоящему изобретению, составленную вместе с и/или совместно вводимую вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, *например*, одним или несколькими средствами против
15 злокачественного новообразования, цитотоксическими или цитостатическими средствами, гормональной терапией, вакцинами, и/или другой иммунотерапией. В других вариантах осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, может вводиться в комбинации с другими терапевтическими модальностями лечения, включающих хирургическое вмешательство, облучение, криохирургию, и/или
20 термотерапию. В таких комбинационных терапиях могут преимущественно использоваться более низкие дозировки вводимых терапевтических средств, что, таким образом, позволяет избежать возможных токсичностей или осложнений, ассоциированных с различными монотерапиями.

Под выражением "в комбинации с" не подразумевают то, что терапия или
25 терапевтические средства должны вводиться в одно и то же время и/или быть составлены для доставки вместе, несмотря на то, что эти способы доставки попадают в объем, описанный в настоящем документе. Молекулы антитела против PD-1 и антитела против M-CSF могут вводиться параллельно с, до или после одной или нескольких других дополнительных терапий или терапевтических средств. Молекулы антитела против
30 PD-1 и антитела против M-CSF и другое средство или терапевтический протокол могут вводиться в любом порядке. В целом, каждое средство будет вводиться при дозе и/или по графику выполнения, определенных для данного средства. Следует дополнительно учитывать, что используемое дополнительное терапевтическое средство может вводиться вместе в единой композиции или вводиться отдельно в различных композициях. Как
35 правило, ожидают, что дополнительные терапевтические средства, используемые в комбинации, будут использоваться при уровнях, которые не превышают уровней, при которых они используются индивидуально. В нескольких вариантах осуществления, уровни, используемые в комбинации, будут ниже, чем уровни, используемые индивидуально.

40 В некоторых вариантах осуществления, комбинацию совместно изобретению вводят в комбинации с одним или несколькими другими ингибиторами PD-1, PD-L1 и/или PD-L2, известными в данной области. Антагонист может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, гибридный белок или олигопептид. В нескольких вариантах осуществления, другое антитело против PD-1 выбирают из
45 MDX-1106, Merck 3475 или CT-011. В нескольких вариантах осуществления, ингибитором PD-1 является иммуноадгезин (*например*, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или связывающую PD-1 часть PD-L1 или PD-L2, гибридную с константной областью (*например*, областью Fc последовательности иммуноглобулина). В нескольких

вариантах осуществления, ингибитором PD-1 является AMP-224. В нескольких вариантах осуществления, ингибитор PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1. В нескольких вариантах осуществления, антагонист связывания против PD-L1 выбирают из YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105. MDX-1105, также известный как BMS-936559, является антителом против PD-L1, описанным в WO2007/005874. Антитело YW243.55.S70 (последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи показаны в SEQ ID No. 20 и 21, соответственно) является антителом против PD-L1, описанным в WO 2010/077634.

MDX-1106, также известный как MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558, представляет собой антитело против PD-1, описанное в WO2006/121168. Merck 3745, также известное как MK-3475 или SCH-900475, представляет собой антитело против PD-1, описанное в WO2009/114335. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 раскрыты в WO2009/101611. В других вариантах осуществления, антителом против PD-1 является пембролизумаб. Пембролизумаб (Торговое наименование Китруда, ранее ламбролизумаб, также известный как MK-3475) раскрыт, *например*, в Hamid, O. *et al.* (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44. AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; *например*, раскрыт в WO2010/027827 и WO2011/066342), представляет собой Fc гибридный растворимый рецептор PD-L2, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1. Другие антитела против PD-1 включают AMP 514 (Амплимун), среди других, *например*, антитела против PD-1, раскрытые в US 8,609,089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

Иллюстративные другие средства, которые могут комбинироваться с комбинацией согласно изобретению, могут включать химиотерапевтические средства для стандартного лечения, включающие, но не ограниченные приведенными, анастрозол (Arimidex[®]), бикалутамид (Casodex[®]), блеомицина сульфат (Blenoxane[®]), бусульфан (Myleran[®]), бусульфан для инъекций (Busulfex[®]), капецитабин (Xeloda[®]), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin[®]), кармустин (BiCNU[®]), хлорамбуцил (Leukeran[®]), цисплатин (Platinol[®]), кладрибин (Leustatin[®]), циклофосфамид (Cytosan[®] или Neosar[®]), цитарабин, цитозина арабинозид (Cytosar-U[®]), цитарабин липосомальный для инъекций (DepoCyt[®]), дакарбазин (DTIC-Dome[®]), дактиномицин (Actinomycin D, Cosmegen), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine[®]), даунорубицина цитрат липосомальный для инъекций (DaunoXome[®]), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere[®]), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin[®], Rubex[®]), этопозид (Vepesid[®]), флударабина фосфат (Fludara[®]), 5-фторурацил (Adrucil[®], Efudex[®]), флутамид (Eulexin[®]), тезацитибин, Гемцитабин (дифтордезоксидцитидин), гидроксимочевину (Hydrea[®]), Идарубицин (Idamycin[®]), ифосфамид (IFEX[®]), иринотекан (Camptosar[®]), L-аспарагиназа (ELSPAR[®]), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran[®]), 6-меркаптопурин (Purinethol[®]), метотрексат (Folex[®]), митоксантрон (Novantrone[®]), милотарг, паклитаксел (Taxol[®]), феникс (Иттрий 90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с кармустиновым имплантатом (Gliadel[®]), тамоксифена цитрат (Nolvadex[®]), тенипозид (Vumon[®]), 6-тиогуанин, тиотепа, тирапазамин (Tirazone[®]), топотекана гидрохлорид для инъекций

(Нусамптин[®]), винбластин (Velban[®]), винкристин (Oncovin[®]), винорелбин (Navelbine[®]), Ибрутиниб, иделалисиб и брентуксимаба ведотин.

Иллюстративные алкилирующие средства включают, без ограничения, азотные мустарды, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены):

урациловый мустард (Aminouracil Mustard[®], Chlorethaminacil[®], Demethyldopan[®], Desmethyldopan[®], Haemanthamine[®], Nordopan[®], Uracil nitrogen mustard[®], Uracillost[®], Uracilmostaza[®], Uramustin[®], Uramustine[®]), хлорметин (Mustargen[®]), циклофосфамид (Cytoxan[®], Neosar[®], Clafen[®], Endoxan[®], Procytox[®], Revimmune[™]), ифосфамид (Mitoxana[®]), мелфалан (Alkeran[®]), Хлорамбуцил (Leukeran[®]), пипоброман (Amedel[®], Vercyte[®]), триэтиленмеламин (Hemel[®], Hexalen[®], Hexastat[®]), триэтилентиофосфорамин, Темозоломид (Temodar[®]), тиотепа (Thioplex[®]), бусульфан (Busilvex[®], Myleran[®]), кармустин (BiCNU[®]), ломустин (CeeNU[®]), стрептозоцин (Zanosar[®]), и Дакарбазин (DTIC-Dome[®]).
Дополнительные иллюстративные алкилирующие средства включают, без ограничения, Оксалиплатин (Eloxatin[®]); Темозоломид (Temodar[®] и Temodal[®]); Дактиномицин (также известный, как актиномицин-D, Cosmegen[®]); Мелфалан (также известный как L-PAM, L-сарколизин и фенилаланиновый мустард, Alkeran[®]); Алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen[®]); Кармустин (BiCNU[®]); Бендамустин (Treanda[®]); Бусульфан (Busulfex[®] и Myleran[®]); Карбоплатин (Paraplatin[®]); Ломустин (также известный как CCNU, CeeNU[®]); Цисплатин (также известный как CDDP, Platinol[®] и Platinol[®]-AQ); Хлорамбуцил (Leukeran[®]); Циклофосфамид (Cytoxan[®] и Neosar[®]); Дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазола карбоксамид, DTIC-Dome[®]); Альтетамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen[®]); Ифосфамид (Ifex[®]); Преднумустин; Прокарбазин (Matulane[®]); Мехлорэтамин (также известный как азотный мустард, мустин и мехлорэтамина гидрохлорид, Mustargen[®]); Стрептозоцин (Zanosar[®]); Тиотепа (также известный как тиофосфамид, TESPA и TSPA, Thioplex[®]); Циклофосфамид (Endoxan[®], Cytoxan[®], Neosar[®], Procytox[®], Revimmune[®]); и Бендамустина HCl (Treanda[®]).

Иллюстративные антрациклины включают, *например*, доксорубицин (Adriamycin[®] и Rubex[®]); блеомицин (lenoxane[®]); даунорубицин (даунорубицина гидрохлорид, дауномицин и рубидомицина гидрохлорид, Cerubidine[®]); даунорубицин липосомальный (липосомы с даунорубицина цитратом, DaunoXome[®]); митоксантрон (DHAD, Novantrone[®]); эпирубицин (Ellence[™]); идарубицин (Idamycin[®], Idamycin PFS[®]); митомицин С (Mutamycin[®]); гелданамицин; гербимицин; равидомицин; и дезацетилравидомицин.

Иллюстративные алкалоиды барвинка, которые могут применяться в комбинации с молекулами антитела против PD-1, по отдельности или в комбинации с одним другим иммуномодулятором (*например*, молекулой антитела против LAG-3, против PD-L1 или против TIM-3), включают, но не ограничены приведенными, винорелбина тартрат (Navelbine[®]), Винкристин (Oncovin[®]), и Виндезин (Eldisine[®]); винбластин (также известный как винбластина сульфат, винкалейкобластин и VLB, Alkaban-AQ[®] и Velban[®]);

и винорелбин (Navelbine®).

Композиции и применения

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому продукту или промышленно
 5 изготовленной упаковке, содержащим комбинационный продукт согласно изобретению,
 описанный в настоящем документе, в частности, вместе с инструкциями по
 одновременному, отдельному или последовательному применению (особенно, для
 проявления совместной активности) его при лечении злокачественного новообразования.
 В одном аспекте, настоящее изобретение предоставляет композиции, *например*,
 10 фармацевтически приемлемые композиции, которые включают молекулы антитела
 против PD-1, описанные в настоящем документе, и молекулы антитела против M-CSF,
 описанные в настоящем документе, составленные вместе с фармацевтически приемлемым
 носителем. Как применяют в настоящем описании, "фармацевтически приемлемый
 15 носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические
 и замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически
 совместимыми. Носитель может подходить для внутривенного, внутримышечного,
 подкожного, парентерального, ректального, спинального или эпидермального введения
 (*например*, посредством инъекции или инфузии).

Композиции этого изобретения могут находиться в различных формах. Они
 включают, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как
 20 жидкие растворы (*например*, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или
 суспензии, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от
 предназначенного способа введения и терапевтического применения. Типовые
 предпочтительные композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных
 25 растворов. Предпочтительным способом введения является парентеральный (*например*,
 внутривенный, подкожный, внутривентрикулярный, внутримышечный). В предпочтительном
 варианте осуществления, комбинацию, раскрытую в настоящем описании, вводят
 посредством внутривенной инфузии или инъекции. В одном другом предпочтительном
 варианте осуществления, комбинацию, раскрытую в настоящем описании, вводят
 30 посредством внутримышечной или подкожной инъекции.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в
 условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена как раствор,
 микроэмульсия, дисперсия, липосома, или другая упорядоченная структура, подходящая
 для высокой концентрации антител. Стерильные инъекционные растворы могут быть
 35 получены посредством введения активного соединения (*т.е.*, антитела или части
 антитела) в требуемом количестве в соответствующем растворителе с одним
 ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как требуется, с
 последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии получают
 посредством введения активного соединения в стерильную несущую среду, которая
 40 содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, что
 перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных
 инъекционных растворов, предпочтительными способами получения являются сушка
 в вакууме и лиофилизация, которые дают на выходе порошок активного ингредиента
 плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его, ранее подвергнутого
 45 стерилизующей фильтрации раствора. Подходящая текучесть раствора может
 поддерживаться, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин,
 посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством
 применения поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание
 инъекционных композиций может придаваться посредством включения в композицию

средства, которое замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Фармацевтические композиции для применения в раскрытых способах могут быть изготовлены общепринятым образом. Применение антител в качестве активного ингредиента фармацевтических препаратов в настоящее время является широко

распространенным, включая продукты Herceptin[®] (трастузумаб), Rituxan[®] (ритуксимаб), Synagis[®] (паливизумаб) и т.д. Методы лиофилизации, получения водных лекарственных форм и очистки антител до фармацевтической степени чистоты хорошо известны в данной области.

Антитела типовым образом составляют либо в водной форме, готовой для парентерального введения или в виде лиофилизатов для восстановления с подходящим разбавителем перед введением. В нескольких вариантах осуществления раскрытых способов и применений, антитела согласно настоящему изобретению составляют в виде лиофилизата. Подходящие лекарственные формы лиофилизата могут быть восстановлены в небольшом жидком объеме (например, 2 мл или менее) для обеспечения подкожного введения и могут обеспечить растворы с низкими уровнями агрегации антител. Для немедленного введения его растворяют в подходящем водном носителе, например, стерильной воде для инъекций или стерильном забуференном физиологическом растворе. Если получение раствора большего объема для введения посредством инфузии считают желательным в большей степени, чем для введения болюсной инъекцией, преимущественным может быть введение человеческого сывороточного альбумина или собственной гепаринизированной крови пациента в физраствор во время составления. Наличие избытка такого физиологически инертного белка предотвращает потерю антитела посредством адсорбции на стенках контейнера и трубках, применяемых с инфузионным раствором. Если применяют альбумин, подходящая концентрация составляет от 0,5 до 4,5% масс. физраствора.

Способы и скорости введения

Молекулы антитела комбинации, раскрытой в настоящем описании, могут вводиться посредством различных способов, известных в данной области, хотя для многих терапевтических применений, предпочтительным путем/способом введения является внутривенная инъекция или инфузия. См. например, Sachs et al., Optimal Dosing for Targeted Therapies in Oncology: Drug Development Cases Leading by Example, Clin. Cancer Res; 22(6) 2016; Bai et al, A Guide to Rational Dosing of Monoclonal Antibodies, Clin. Pharmacokinet. 2012; 51 (2) 119-135; Le Tourneau, J., Dose Escalation Methods in Phase I Cancer Clinical Trials, J Natl Cancer Inst 2009; 101:708-720; Wang, D. et al., Fixed Dosing Versus Body Size-Based Dosing of Monoclonal Antibodies in Adult Clinical Trials, J Clin Pharmacol 2009;29:1012-1024; Hempel, G. et ano, Flat-Fixed Dosing Versus Body Surface Area-Based Dosing of Anticancer Drugs: There Is a Difference, Oncologist 2007; 12:924-926, Mathijssen, R., Flat-Fixed Dosing Versus Body Surface Area-Based Dosing of Anticancer Drugs in Adults: Does It Make a Difference?, Oncologist, 2007;12:913-923; Leveque, Evaluation of Fixed Dosing of New Anticancer Agents in Phase I Studies, Anticancer Research 28:300275-2078 (2008), Gurney, How to calculate dose of chemotherapy, British Journal of Cancer (2002) 86, 1297-1302; Например, молекулы антитела могут вводиться посредством внутривенной инфузии при скорости более 20 мг/мин, например, 20-40 мг/мин, и обычно свыше или равной 40 мг/мин для достижения дозы приблизительно от 35 до 440 мг/м², обычно приблизительно от 70 до 310 мг/м², и более типично, приблизительно от 110 до 130 мг/м². В вариантах осуществления, молекулы антитела могут вводиться посредством внутривенной инфузии при скорости менее 10 мг/мин; предпочтительно меньшей или равной 5 мг/мин для достижения дозы

приблизительно от 1 до 100 мг/м², предпочтительно приблизительно от 5 до 50 мг/м², приблизительно от 7 до 25 мг/м² и более предпочтительно, приблизительно от 10 мг/м². Путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желательных результатов.

Режимы дозировки

Режимы дозировки регулируют, чтобы обеспечить оптимальный желательный ответ (*например*, терапевтический ответ). Например, может вводиться единственный болюс, несколько разделенных доз могут вводиться с течением времени или доза может быть пропорционально снижена или увеличена, как указывают требования терапевтической ситуации. Особенно преимущественно составлять парентеральные композиции в виде единичной дозированной формы для простоты введения и однородности дозировки. Единичная дозированная форма, как применяют в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, подходящих в качестве единичных дозровок для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предварительно заданное количество активного соединения, рассчитанное, чтобы производить желательный терапевтический эффект в ассоциации с желательным фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных дозированных форм согласно изобретению напрямую зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического эффекта и (б) ограничений, характерных для области составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов, и определяется ими.

Дозировка по массе

Антитело может быть дозировано в соответствии с массой тела пациента.

Иллюстративный, неограничивающий интервал для терапевтически или профилактически эффективного количества молекул антитела составляет 0,1-30 мг/кг, более предпочтительно 1-25 мг/кг. Дозировки и терапевтические режимы для комбинаций, раскрытых в настоящем описании, могут быть определены квалифицированным специалистом в данной области. Их можно доставлять отдельно или одновременно. В некоторых вариантах осуществления, антитело против PD-1 вводят посредством инъекции (*например*, подкожно или внутривенно) при дозе, равной приблизительно от 1 до 40 мг/кг, *например*, от 1 до 30 мг/кг, *например*, приблизительно от 3 до 25 мг/кг, приблизительно от 3 до 20 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг, от 3 до 10 мг/кг, от 5 до 15 мг/кг, от 10 до 20 мг/кг, от 15 до 25 мг/кг, или приблизительно 3 мг/кг, и антитело против M-CSF вводят посредством инъекции (*например*, подкожно или внутривенно) при дозе равной приблизительно от 1 до 40 мг/кг, *например*, от 1 до 30 мг/кг, *например*, приблизительно от 3 до 25 мг/кг, приблизительно от 10 до 20 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг, от 3 до 10 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг, от 5 до 15 мг/кг, от 10 до 20 мг/кг, от 15 до 25 мг/кг, или приблизительно 3 мг/кг.

Базовая дозировка

Антитела могут также вводиться пациентам в виде базовой дозировки, которая обеспечивает фиксированное или заранее заданное количество дозировки для каждого пациента. Термины базовая дозировка и фиксированная дозировка применяют взаимозаменяемо. Базовое или фиксированное дозирование может быть благоприятным для пациентов, например, чтобы сохранить снабжение лекарственными средствами и снизить ошибки фармацевтики.

В нескольких вариантах осуществления, молекулу антитела против PD-1 вводят

посредством инъекции (*например*, подкожно или внутривенно) при дозе (*например*, базовой дозе), равной приблизительно от 200 мг до 500 мг, *например*, приблизительно от 250 мг до 450 мг, приблизительно от 300 мг до 400 мг, приблизительно от 250 мг до 350 мг, приблизительно от 350 мг до 450 мг или приблизительно от 300 мг или

5 приблизительно 400 мг. Схема дозирования (*например*, базовая схема дозирования) может варьировать от, например, одного раза в неделю до одного раза в каждые 2, 3, 4, 5 или 6 недель. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против PD-1 вводят при дозе от приблизительно 300 мг до 400 мг один раз в три недели или один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против PD-1

10 вводят при дозе приблизительно от 300 мг один раз в три недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против PD-1 вводят при дозе приблизительно от 400 мг один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против PD-1 вводят при дозе приблизительно от 300 мг один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против PD-1 вводят при дозе

15 приблизительно от 400 мг один раз в три недели.

Антитело против M-CSF может аналогично вводиться в виде базовой дозировки. В нескольких вариантах осуществления, молекулу антитела против M-CSF вводят посредством инъекции (*например*, подкожно или внутривенно) при дозе (*например*, базовой дозе) от приблизительно 200 мг до 500 мг, *например*, приблизительно от 250

20 мг до 450 мг, приблизительно от 300 мг до 400 мг, приблизительно от 250 мг до 350 мг, приблизительно от 350 мг до 450 мг, или приблизительно от 300 мг или приблизительно 400 мг. Дополнительно, молекула антитела против M-CSF может также вводиться посредством инъекции при базовой дозе, равной приблизительно от 300 мг до 800 мг, включающей приблизительно 800 мг. Схема дозирования (*например*, базовая схема

25 дозирования) может варьировать, например, от одного раза в неделю до одного раза каждые 2, 3, 4, 5 или 6 недель. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против M-CSF вводят при дозе от приблизительно 300 мг до 400 мг один раз в три недели или один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против M-CSF вводят при дозе от приблизительно 300 мг один раз в три

30 недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против M-CSF вводят при дозе от приблизительно 400 мг один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против M-CSF вводят при дозе от приблизительно 300 мг один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления, молекулу антитела против M-CSF вводят при дозе от приблизительно 400 мг один раз в три недели.

35 **Схема дозирования**

Схема дозирования может варьировать от, *например*, одного раза в неделю до одного раза каждые 2, 3 или 4 недели. В одном варианте осуществления, антитело против PD-1 и антитело против M-CSF или оба вида молекул вводят при дозе приблизительно от 3 до 10 мг/кг раз в две недели. Следует отметить, что значения дозировки могут

40 варьировать в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего облегчению. Следует дополнительно понимать, что для каждого конкретного субъекта, специфичные режимы дозировки должны регулироваться с течением времени в соответствии с потребностью индивидуума и профессиональным суждением лица, вводящего композицию или осуществляющего надзор за введением композиции, и то, что интервалы

45 дозировки, приведенные в настоящем описании, являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практической реализации заявленной композиции.

Иллюстративные дозы для трех (или более) режимов введения средства являются

следующими. Антитело против PD-1 и антитело против M-CSF или оба вида молекул могут вводиться, *например*, при дозе, равной приблизительно от 1 до 40 мг/кг, *например*, от 1 до 30 мг/кг, *например*, приблизительно от 5 до 25 мг/кг, приблизительно от 10 до 20 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг, или приблизительно от 3 мг/кг. Молекула антитела против M-CSF может вводиться, *например*, при дозе, равной приблизительно от 1 до 40 мг/кг, *например*, от 1 до 30 мг/кг, *например*, приблизительно от 5 до 25 мг/кг, приблизительно от 10 до 20 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг.

Биомаркеры

Изобретение дополнительно включает отбор пациентов, которые могут получить благоприятное воздействие в основном от лечения с использованием комбинации молекулы антитела против PD-1 и молекулы антитела против M-CSF. Отбор пациентов может достигаться определением присутствия PD-1 или присутствия опухолеассоциированных макрофагов (TAMS). Без ограничения какой-либо теорией, в нескольких вариантах осуществления, пациент наиболее вероятно реагирует на лечение комбинацией согласно изобретению, если пациент имеет злокачественное новообразование, которое в высокой степени экспрессирует PD-L1, и/или злокачественное новообразование инфильтруется противоопухолевыми иммунными клетками, *например*, TIL и/или имеет высокий уровень TAMS, например, определенный наблюдением CD163 или CD163/CD8, как описано ниже.

В дополнение к другим потенциальные предикторы возможной эффективности действия комбинации включают уровни экспрессии FoxP3, PD-L1 и CD68 на исходном уровне (модуляция фенотипа TAM и TIL) и конечные результаты противоопухолевой активности (например, на протяжении всей частоты ответа). В одном варианте осуществления согласно настоящему изобретению кровь пациента может быть проанализирована на присутствие CD163 или CD163/CD8, как единственного предиктора эффективности действия комбинации.

Фармакодинамический эффект комбинации потенциально можно оценить по уровням экспрессии CD8, CD163, FoxP3, PD-L1, CD68 на исходном уровне и после исходного уровня (модуляция фенотипа TAM и TIL), CD4, LAG3 или TIM3, (а также CD80, LKB2, CCL2, если доступно). В дополнение, для оценки фармакодинамики можно измерять системные уровни цитокинов на исходном уровне и после исходного уровня (например, GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-18, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α или TNF- β).

ORR согласно RECIST v 1.1 у пациентов с мутантными BRCA1/BRCA2 и немутантными TNBC, соответственно может применяться, чтобы оценить влияет ли статус BRCA1 и BRCA2 на ответ на лечение пациентов с TNBC. ORR по RECIST v1.1 в соответствии со статусом MSI и мутационной нагрузкой позволяет оценить влияет ли статус нестабильности микросателлита и мутационная нагрузка на общую частоту ответа.

Противоопухолевую активность комбинации MCS110 у PDR001 у пациентов с меланомой с первоначальной или приобретенной резистентностью к целевым терапиям с PD-1/PDL-1 можно оценить по ORR согласно RECIST v. 1.1 у пациентов с меланомой с первоначальной или приобретенной резистентностью к PD-1 (по истории болезни), соответственно.

Отбор пациентов, имеющих PD-1

В одном примере, может иметь место определение присутствия PD-1 для определения противоопухолевых иммунных клеток посредством аналитического теста на клетки, позитивные для CD8, PD-L1, и/или IFN- γ ; таким образом, уровни CD8, PD-L1 и/или IFN- γ

могут служить для считывания данных по уровням TIL в микроокружении. В некоторых вариантах осуществления, микроокружение злокачественного новообразования называют трижды позитивным для PD-L1/CD8/IFN- γ .

Соответственно, в некоторых аспектах, данная заявка предоставляет способы определения того, является ли образец опухоли позитивным для одного или нескольких из PD-L1, CD8, и IFN- γ , и того, является ли образец опухоли позитивным для одного или нескольких, *например*, двух или всех трех маркеров, а затем введения пациенту терапевтически эффективного количества молекулы антитела против PD-1, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими иммуномодуляторами или противоопухолевыми средствами.

При следующих показаниях, большая часть пациентов является трижды позитивной для PD-L1/CD8/IFN- γ : TN-рак молочной железы. Независимо от того большая или малая фракция пациентов является трижды позитивной для этих маркеров, скрининг пациентов по этим маркерам позволяет идентифицировать фракцию пациентов, которая имеет особенно высокую вероятность благоприятного ответа на терапию с использованием антитела против PD-1 (*например*, блокировки антитела против PD-1) в комбинации с M-CSF-1 и необязательно одного или нескольких других иммуномодуляторов (*например*, молекулы антитела против TIM-3, молекулы антитела против LAG-3, или молекулы антитела против PD-L1) и/или противоопухолевых средств.

В нескольких вариантах осуществления, образец злокачественного новообразования классифицируют как трижды позитивный для PD-L1/CD8/IFN- γ . Это измерение можно грубо свести к определению двух порогов: классифицируют ли индивидуальную клетку как позитивную, и классифицируют ли образец в целом как позитивный. Во-первых, в индивидуальной клетке, можно измерить уровень PD-L1, CD8, и/или IFN- γ . В нескольких вариантах осуществления, клетка, которая является позитивной для одного или более маркеров, представляет собой клетку, которая имеет более высокий уровень маркера по сравнению с контрольной клеткой или эталонным значением. Например, в нескольких вариантах осуществления, высокий уровень PD-L1 в данной клетке представляет собой уровень, более высокий, чем уровень PD-L1 в соответствующей незлокачественной ткани у пациента. В качестве одного другого примера, в нескольких вариантах осуществления, высокий уровень CD8 или IFN- γ в данной клетке является уровнем этого белка, обычно наблюдаемый в TIL. Во-вторых, можно также измерить процентную долю клеток в образце, которые являются позитивными для PD-L1, CD8 и/или IFN- γ . (Для единичной клетки необязательно экспрессировать все три маркера.) В нескольких вариантах осуществления, трижды позитивный образец является образцом, который имеет высокую процентную долю клеток, *например*, выше эталонного значения или выше, чем у контрольного образца, которые являются позитивными для этих маркеров.

В других вариантах осуществления, можно измерить общие уровни PD-L1, CD8, и/или IFN- γ в образце. В этом случае, высокий уровень CD8 или IFN- γ в образце может быть уровнем такого белка, обычно наблюдаемый в опухоли, инфильтрованной TIL. Аналогично, высокий уровень PD-L1 может быть уровнем такого белка, обычно наблюдаемый в образце опухоли, *например*, микроокружении опухоли.

Идентификация подмножеств пациентов, которые являются трижды позитивными для PD-L1/CD8/IFN- γ отображает некоторые субпопуляции пациентов, которые, вероятно, являются восприимчивыми к терапии антителом против PD-1. Например, многие пациенты с IM-TN (иммуномодуляторным, трижды негативным) раком молочной железы являются трижды позитивными для PD-L1/CD8/IFN- γ . IM-TN рак молочной железы описан в, *например*, Brian D. Lehmann *et al.*, "Identification of human triple negative

breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies", *J Clin Invest.* Jul 1, 2011; 121(7): 2750-2767. Трижды негативные злокачественные новообразования молочной железы являются такими новообразованиями, которые не экспрессируют эстрогеновый рецептор (ER), прогестероновый рецептор (PR) и Her2/neu. Эти виды рака трудно поддаются лечению, поскольку они обычно невосприимчивы к средствам, которые нацелены на ER, PR, и Her2/neu. Трижды негативные злокачественные новообразования молочной железы могут быть дополнительно подразделены на различные классы, один из которых является иммуномодуляторным. Как описано в Lehmann *et al.*, IM-TN рак молочной железы обогащен факторами, вовлеченными в процессы иммунных клеток, например, одной или несколькими из сигнальных систем иммунной клетки (*например*, путь TH1/TH2, NK-клеточный путь, сигнальный путь В-клеточного рецептора, путь DC, и сигнальная система Т-клеточного рецептора), цитокиновая сигнальная система (*например*, цитокиновый путь, путь IL-12 и путь IL-7), процессинг и презентирование антигена и передача сигналов через центральные пути передачи иммунных сигналов (*например*, сигнальная система NFκB, TNF, и JAK/STAT), генами, вовлеченными в функцию Т-клеток, иммунную транскрипцию, интерфероновый (IFN) ответ и процессинг антигена. Соответственно, в нескольких вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергнутое лечению представляет собой злокачественное новообразование, которое является, или определяется как, позитивное для одного или нескольких маркеров IM-TN рака молочной железы, *например*, фактора, который стимулирует одну или несколько сигнальных систем иммунной клетки (*например*, путь TH1/TH2, NK-клеточный путь, сигнальный путь В-клеточного рецептора, путь DC, и сигнальная система Т-клеточного рецептора), цитокиновую сигнальную систему (*например*, цитокиновый путь, путь IL-12 и путь IL-7), процессинг и презентирование антигена и передачу сигналов через центральные пути передачи иммунных сигналов (*например*, сигнальную систему NFκB, TNF, и JAK/STAT), гены, вовлеченные в функцию Т-клеток, иммунную транскрипцию, интерфероновый (IFN) ответ и процессинг антигена.

Отбор пациентов с использованием ТАМ

Настоящее изобретение направлено на применение комбинации антитела против M-CSF, описанного в Таблице 1, и антитела против PD-1, описанного в Таблице 2, для лечения злокачественного новообразования, такого как трижды негативный рак молочной железы. В настоящее время не существует целенаправленных терапий для этого подтипа рака молочной железы, и единственным вариантом лечения является химиотерапия. Настоящее изобретение предоставляет персонализированную терапию, которая максимизирует благоприятное воздействие и минимизирует риск применения молекулы антитела против M-CSF в популяциях больных раком посредством идентификации тех пациентов, которые вероятно будут иметь благоприятный ответ, до лечения с использованием терапии M-CSF. В одном примере, настоящее изобретение включает идентификацию пациентов, имеющих злокачественное новообразование, таких как пациенты с трижды негативным раком молочной железы, которые имеют уровень опухолеассоциированных макрофагов (ТАМ), указывающий на то, что пациент, вероятно, будет иметь ответ на лечение с использованием антагониста M-CSF. Конкретно, уровень ТАМ у пациента измеряют посредством определения уровня CD163 (*например*, мРНК или белка) в образце от пациента и уровень CD163 у пациента, в свою очередь, применяют для указания на то, что пациент, наиболее вероятно, будет иметь благоприятный ответ на лечение с использованием M-CSF. В одном примере, если пациент имеет увеличенный уровень CD163 по сравнению с контролем, тогда пациента

идентифицируют как пациента, наиболее вероятно реагирующего на антагонист М-CSF. В одном другом примере, если пациент имеет уровень CD163, равный или превышающий предварительно определенный уровень CD163 ("порог"), тогда пациента идентифицируют как пациента, наиболее вероятно реагирующего на антагонист М-CSF. Уровень экспрессии CD163, анализируемый в образце, полученном от пациента со злокачественным новообразованием, может относиться, например, к экспрессии мРНК и/или белка.

Приготовление образцов

Может применяться любой соответствующий образец или тестируемый образец клеток, взятый от индивидуума, имеющего злокачественное новообразование. Как правило, тестируемый образец клеток или образец ткани будет получен от субъекта со злокачественным новообразованием посредством биопсии или хирургической резекции. Образец клеток, ткани или жидкой среды может удаляться посредством игольной аспирационной биопсии. Для этого, тонкую иглу, присоединенную к шприцу, вводят через кожу в ткань, представляющую интерес. Иглу обычно направляют в интересующую область, используя визуализацию ультразвуком или с помощью компьютерной томографии (КТ). Как только иглу вводят в ткань, с помощью шприца создают вакуум, так что клетки или жидкая среда могут быть отсосаны через иглу и собраны в шприце. Образец клеток или ткани также может быть удален посредством эксцизионной биопсии или кор-биопсии. Для этого, конус, цилиндр или крошечный кусочек ткани удаляют из области интереса. Визуализацию с использованием КТ, ультразвука или эндоскопа, как правило, применяют для направления этого типа биопсии. Более конкретно, полное злокачественное повреждение может удаляться посредством эксцизионной биопсии или хирургической резекции. В настоящем изобретении, тестируемый образец обычно представляет собой образец клеток, удаленных как часть хирургической резекции.

Тестируемый образец из, например, ткани, может также храниться, например, в растворе для стабилизации РНК (Ambion; Austin Tex.) или быстро заморожен и храниться при -80°C для более позднего применения. Биопсийный образец ткани также может быть зафиксирован с использованием фиксатора, такого как формальдегид, параформальдегид, или смесь уксусная кислота/этанол. Зафиксированный образец ткани может быть залит в воск (парафин) или пластмассовой смоле. Залитый образец ткани (или замороженный образец ткани) может быть нарезан на тонкие срезы. РНК или белок также можно экстрагировать из зафиксированного или залитого воском образца ткани или замороженного образца ткани. Как только образец клеток или образец ткани удаляют из субъекта со злокачественным новообразованием, он может быть обработан для выделения РНК или белка с использованием методов, хорошо известных в данной области, и как описано ниже.

Пример экстракции РНК из биопсийной пробы, взятой у пациента со злокачественным новообразованием, может включать, например, лизис тиоцианатом гуанидия с последующим центрифугированием в CsCl. РНК из одиночных клеток может быть получена, как описано в методах получения библиотек кДНК из одиночных клеток. В одном варианте осуществления, популяция РНК может быть обогащена CD163. Обогащение может осуществляться, например, посредством статистических гексамеров и праймер-специфичного синтеза кДНК или множества циклов линейной амплификации, основанной на синтезе кДНК, и матрично-ориентированной на транскрипцию *in vitro*.

Субъект с опухолью или злокачественным новообразованием, как правило, является млекопитающим субъектом, таким как примат. В иллюстративном варианте

осуществления, субъект является человеком.

Наличие ТАМ можно оценить посредством обнаружения присутствия CD163+

В способах, раскрытых в настоящем описании, используют, *среди прочего*, определение уровня CD163. Уровень CD163 является прогностическим для оценки того, реагирует ли индивидум с большей вероятностью на антагонист М-CSF. В одном примере уровень CD163, который является прогностическим, относится к уровню экспрессии, который выше медианного уровня (контроля) для экспрессии CD163 при злокачественном новообразовании или больше предварительно заданного порогового значения.

В одном варианте осуществления, уровень экспрессии белка CD163 сравнивают с контрольным или пороговым значением для отбора пациентов для лечения с использованием антагониста М-CSF, например, уровень экспрессии CD163 по сравнению с контролем может быть прогностическим для оценки того, что пациент вероятно или маловероятно будет реагировать на антагонист М-CSF, такой как Н-RX1. В одном варианте осуществления, пациентов, имеющих уровень экспрессии белка CD163 (также называемый "плотность ТАМ") свыше порогового уровня, равного 10%, 15%, 20%, 30%, 40% или выше, отбирают для лечения с использованием антагониста М-CSF. Контрольный уровень CD163 можно определить по существу одновременно с измерением экспрессии CD163 или может быть определен прежде.

Обнаружение экспрессии нуклеиновой кислоты CD163

Биологический образец от пациента может быть подвергнут оценке на наличие экспрессии CD163, таким образом, как при участии РНК, любыми применимыми средствами. Увеличенные уровни экспрессии CD163 могут применяться для прогнозирования улучшенного ответа на антагонизм М-CSF для пациентов со злокачественным новообразованием, например, TBNC.

Обнаружение белка CD163

В некоторых случаях, присутствие CD163 можно определить посредством анализа продуктов полипептида CD163. Обнаружение полипептидных продуктов может выполняться с использованием любого метода, известного в данной области, включая, но не ограничиваясь, иммуноцитохимическое окрашивание, ELISA, проточную цитометрию, Вестерн-блоттинг, спектрофотометрию, ВЭЖХ и масс-спектрометрию.

Контроль

Как применяют в настоящем описании, контроли для сравнения могут определяться специалистом в данной области. В одном примере, контроли определяют посредством выбора контрольных образцов со значениями плотности ТАМ, которые задают предельное значение. Например, значение может иметь величину, которая различается между, например, тестируемыми образцами, где индивидум имеет CD163 (или плотность ТАМ) менее 15%, или тестируемыми образцами, где индивидум имеет CD163 (или плотность ТАМ), равную или свыше 15% CD163 (или плотность ТАМ); или между теми тестируемыми образцами, где индивидум, вероятно, получает благоприятное воздействие от терапии антагонистом М-CSF и теми образцами, где, вероятно, не получает его.

В одном другом примере, контроль может представлять собой образец от здорового добровольца или образец от пациента со злокачественным новообразованием, который, как известно, имеет низкую экспрессию CD163 (мРНК или белка), и пациента выбирают для лечения, когда определенное значение CD163 выше, чем у других контролей.

В еще одном другом примере, контрольное значение может являться значением, предварительно заданным в соответствии с историческими контролями в качестве

основы математической модели. Модель, также называемая классификатором, может быть построена, используя уровни экспрессии (например, мРНК или белка) из коллекции пациентов со злокачественным новообразованием (например, TBNC). Математическая модель, может представлять собой, например, любой класс прогностического метода или его вариации, и производное контрольное значение может применяться в качестве порогового значения. Если уровень экспрессии находится на уровне порога или выше, пациент, более вероятно, будет восприимчив к лечению с использованием антагониста М-CSF. В одном варианте осуществления, выбирают индивидуума, который имеет уровень экспрессии CD163, равный или выше порогового, например, он может быть на 15%, 20%, 30%, 40%, или выше.

Отбор и лечение пациентов со злокачественным новообразованием

Уровень экспрессии нуклеиновой кислоты CD163 или белка CD163 позволяет клиницистам обеспечить персонализированную терапию для пациентов со злокачественным новообразованием, таким как TBNC, рак поджелудочной железы, рак яичника, меланома, назофарингеальная карцинома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, мезотелиома, почечно-клеточная карцинома или глиобластома, т.е., он позволяет определить, можно ли селективно лечить пациента с использованием антагониста М-CSF. Таким образом, клиницист может максимизировать благоприятное воздействие и минимизировать риск антагонизма М-CSF в целой популяции пациентов, страдающих от злокачественного новообразования. Различные аспекты изобретения описаны ниже с дополнительными подробностями. Дополнительные определения устанавливаются на протяжении всего описания.

Пример 1

Фазу Ib клинических испытаний выполняют с MCS110 и PDR001, вводимыми один раз в 3 недели посредством в.в. инфузий в течение 30 минут и 1 часа, соответственно. Лекарственные средства будут вводиться раздельно с по меньшей мере 30-минутным перерывом между двумя антителами. Инфузии каждого антитела могут продлеваться до 2 часов, если имеются клинические показания. Описанный ниже режим дозирования применяют в приведенной ниже Таблице 5.

Таблица 5. Пример режима дозирования

Исследуемые терапии	Фармацевтическая форма и путь введения	Доза	Частота и/или режим
MCS110	Жидкий концентрат в пузырьке для в.в. инфузии	3 мг/кг (начальная доза)	Каждые 3 недели
PDR001	Лиофилизат в пузырьке для в.в. инфузии	100 мг (начальная доза)	Каждые 3 недели

Оба исследуемых лекарственных средства могут инфузионно вводиться с использованием одного и того же участка для в.в. доступа. Следуют одной и той же последовательности введения для всех пациентов, т.е. PDR001 должен инфузионно вводиться первым. Если реакция на инфузию происходит после введения PDR001, последующую инфузию MCS110 откладывают, пока для пациента не станет безопасным получать MCS110 на основании клинического суждения исследователя. Отсрочка между инфузиями PDR001 и MCS110 может достигать 4 часов, если имеются клинические показания.

Запланированная доза лекарственных средств текущего исследования может быть отсрочена вплоть до 7 дней, для восстановления от предшествующих АЕ или при пропущенных визитах. Если запланированная доза лекарственных средств текущего исследования отсрочена более чем на 7 дней вследствие неразрешенных АЕ, введение должно быть пропущено, а лечение возобновляться при более низком уровне дозы

(при соответствии критериям для DLT) во время следующей запланированной дозы. Протокол оценки будет сдвинут соответственно. Задержки приема дозы относятся ко всем лекарственным средствам текущего исследования: для комбинационного лечения с использованием как MCS110, так и PDR001, и для лечения единственным средством, MCS110 или PDR001. Дозу для исследуемого лекарственного средства в случае MCS110 рассчитывают, исходя из массы тела индивидуальных субъектов, измеренной при скрининговом визите и последующих визитах до введения.

Начальная доза

Начальная доза и режим MCS110 будут составлять 3 мг/кг в.в. каждые 3 недели, что соответствует приблизительно 40% дозы единичного средства, вводимого пациентам с PVNS (10 мг/кг каждые 4 недели в исследовании NCT01643850, CMCS110X2201)) и 30% дозы, вводимой в комбинации со смесью карбоплатин/гемцитабин при TNBC (10 мг/кг каждые 3 недели в исследовании NCT02435680, CMCSZ2201).

Доза MCS110, равная 10 мг/кг хорошо переносилась пациентами с PVNS и показывала значительное уменьшение опухоли у пациентов с PVNS. После единичной дозы, равной 3 мг/кг MCS110 у здоровых добровольцев, наблюдали, что CSF-1 насыщался под действием MCS110 в течение приблизительно 21 дня CMCSX2101. Фармакодинамические анализы, проводимые при исследованиях HV, показывают, что ответ циркулирующего биомаркера должен быть близок к максимальному при дозе, равной или выше 5 мг/кг, и минимальным при дозах ниже 3 мг/кг. Учитывая риск потенциальных перекрывающихся профилей токсичности, дозу 3 мг/кг MCS110 выбирают в качестве начальной дозы для части исследования с повышением дозы.

Начальная доза и режим PDR001 составляют 100 мг в.в. каждые 3 недели. PDR001 тестировали до дозы, равной 10 мг/кг каждые 2 недели, в проводящемся исследовании NCT02404441, CPRD001X2101. Никаких MTD не определяли и плановая рекомендуемая доза для фазы два (RP2D) составляет 300 мг (3,75 мг/кг), принимаемые каждые 3 недели или 400 мг (5 мг/кг), принимаемые каждые 4 недели. Обе из предложенных RP2D могут достигать устойчивых средних $C_{остаточных}$ ($C_{остаточной}$) концентраций, которые приблизительно в 77-раз выше, чем действенность EC50 для PDR001 in vitro/ex vivo, оцениваемая как 0,42 мкг/мл. Экспозиция PDR001 при начальной дозе, равной 100 мг Q3W находится в пределах интервала этих значений, наблюдаемых в исследовании CPRD001X2101 без каких-либо DLT. Ожидается, что PDR001 будет демонстрировать противоопухолевую активность при дозах в 100 мг или выше каждые 3 недели.

Таблица 6

Уровень дозы*	Предложенная доза MCS110	Предложенная доза PDR001
-2**	0,3 мг/кг Q3W	100 мг Q3W
-1**	1 мг/кг Q3W	100 мг Q3W
1 (начальная доза)	3 мг/кг Q3W	100 мг Q3W
2	3 мг/кг Q3W	300 мг Q3W
3	5 мг/кг Q3W	300 мг Q3W
4	10 мг/кг Q3W	300 мг Q3W
* Во время проведения исследования возможно добавление дополнительных и/или промежуточных уровней дозы. Когорты могут быть дополнены при любом уровне дозы ниже MTD, чтобы лучше понять безопасность, ФК или ФД		
** Уровень дозы -1 или -2 представляет предварительные уровни дозы и/или лечебные дозы, для пациентов, требующих снижения дозы от начального уровня дозы. В этом исследовании никакого снижения ниже уровня дозы -2 не разрешается		

Потенциальная токсичность

Данное исследование является первым исследованием, оценивающим комбинацию MCS110 и PDR001. Потенциальные перекрывающиеся токсичности включают повышения уровней ферментов печени, вызванные иммунной стимуляцией (PDR001), или сниженным

элиминированием ферментов печени (MCS110), более высокую частоту или аггравацию иммуноопосредованных нежелательных явлений и кожную токсичность.

Дозо-лимитирующую токсичность (DLT) определяют как нежелательное явление или аномальное лабораторное значение CTCAE Степени ≥ 3 , оцениваемое как не относящееся к заболеванию, прогрессированию заболевания, интеркуррентной болезни или сопутствующим препаратам, которое происходит в интервале первых двух циклов лечения с использованием комбинационной терапии, и соответствует любому из критериев, включенных в Таблице 7.

Появившиеся данные в новой области исследований иммунологических комбинаций позволяют предположить, что некоторые связанные с иммунной системой нежелательные явления имеют продолжительную латентность. Как таковое, окно DLT для когорты с комбинацией в этом испытании расширяют до продолжительности двух циклов или 42 дней.

Общая терминология критериев нежелательных явлений Национального института онкологии США (NCI CTCAE) версия 4.03 будет применяться для всей сортировки. С целью решений по повышению дозы, DLT будут учтены и включены в Байесовскую регрессионную логистическую модель (BLRM).

Для пациентов, которые не переносят установленную протоколом схему дозирования, разрешаются регулирования дозы, чтобы позволить пациенту продолжить исследуемое лечение, за исключением периода во время первых двух циклов, когда модификации дозы допускаются лишь в том случае, если пациент испытывает DLT. Необходимо применять следующие рекомендации:

Если пациент испытывает АЕ, соответствующее критериям для DLT, как уже указано в Разделе 62.4, лечение должно быть приостановлено. Модификации дозы для токсичностей, относящихся к исследуемому препарату, обобщены в Таблице 6-44. После разрешения Токсичности до Степени 1 или до значения исходного уровня для пациента, пациент может возобновить исследуемое лечение при более низком уровне дозы, чем тестируют в это время (по той же схеме дозирования), если отсутствуют очевидные признаки прогрессирования заболевания по irRC. Решение о продолжении лечения после случая DLT находится на усмотрении Исследователя. После того, как АЕ удовлетворяет критериям для DLT, если пациент возобновляет лечение в исследовании, оно должно проводиться при последующем более низком уровне дозы. Снижения дозы до доз ниже MCS110 0,3 мг/кг/PDR001 100 мг Q3W не разрешаются. Если более 2 последовательных доз должны быть пропущены вследствие токсичностей, относящихся к исследуемому лечению, тогда пациент должен выбыть из исследования, пока пациент не испытает клиническое благоприятное воздействие по мнению исследователя. В этом случае, лечение может продолжаться при дозе, согласованной между Novartis и исследователем.

Если лечение одним из исследуемых лекарственных средств прерывают, пациент может продолжить лечение оставшимся исследуемым лекарственным средством, если исследователь считает, что это наилучшим образом соответствует интересам пациента. Доза оставшегося исследуемого лекарственного средства должна быть согласована между Novartis и исследователем.

В случаях диареи/колита, почечных, легочных, эндокринопатологических, печеночных и кожных АЕ, сначала исключают невоспалительные причины. Если имеются признаки воспалительной причины, лечение проводят согласно Приложению 14.3: Рекомендуемые алгоритмы управления для подозреваемой токсичности, которые включают кортикостероидную терапию.

Критерии для дозо-лимитирующих токсичностей

Таблица 7

5	С целью повышения дозы и расширения когорты, DLT будет определяться следующим образом: Любая Степень 4 АЕ будет считаться DLT за исключением:	
		Нейтропения с продолжительностью ≤ 5 дней, которая не ассоциирована с жаром или другими клиническими симптомами.
		Лимфопения или лейкопения в любой степени
10	Любая Степень 3 АЕ будет считаться DLT за исключением:	
		Нарушения баланса электролитов, которые не ассоциированы с клиническими последствиями и корректируются до ≤ Gr1 при соответствующем управлении или дополнением в интервале 72 часов от наступления.
		Реакция на инфузию, которая разрешается до ≤ Степени 1 в интервале 6 часов.
15		Тошнота и рвота с продолжительностью в течение <2 дней без оптимальной противорвотной терапии.
		Тромбоцитопения без значительного кровотечения.
		Диарея с продолжительностью < 2 дней при оптимальной терапии против диареи.
20		Гипертензия с продолжительностью < 7 дней при оптимальной терапии.
		Инфекция или жар при отсутствии нейтропении с продолжительностью <7 дней.
		Сыпь или светочувствительность с продолжительностью < 7 дней после лечения.
25		Утомляемость с продолжительностью < 7 дней.
		Связанные с иммунной системой нежелательные явления с продолжительностью при Степени 3<7 дней после лечения с использованием кортикостероидов.
		*Повышение СК без ассоциированного мышечного повреждения на усмотрение исследователя
30		*Изолированные повышения AST (без повышений билирубина или ALT ≥ Степень 1)
	Следующая Степень 2 АЕ будет рассматриваться как DLT:	
		Общий билирубин с ≥ CTCАЕ Степени 2 AST/ALT.
35		Пневмония, продолжающаяся >7 дней, несмотря на лечение с использованием кортикостероидов.
		Боль в глазах или снижение остроты зрения, которые не реагируют на местную терапию и не улучшаются до Степени 1 тяжести в интервале 2 недель от инициации местной терапии OR, требуют системного лечения.
		Другие клинически значимые токсичности, включающие одиночное событие или множественные случаи одного и того же события, могут рассматриваться как DLT.
40	*Лечение с использованием MCS110 приводит к повышениям СК и AST без какой-либо связи с мышечным повреждением Radi, 2011 Am J Pathol. 2011 Jul; 179(1):240-7. СК/AST Повышения вызываются сниженной скоростью выведения из кровообращения вследствие уменьшенных количеств макрофагов (купферовских клеток печени) в печени (Раздел 1.2.2.1).	

Таблица 8. Модификации дозировки для токсичностей, связанных с исследуемым препаратом

30	Токсичность	Правила коррекции дозы*
	Гематология	
	Степень 3 фебрильной нейтропении или Степень 4 нейтропении > 5 дней	Отсрочка лечения до ANC ≥ 1000/мм ³ и отсутствие жара.
35	Степень 3 тромбоцитопении (TCP) с клинически значимым кровотечением или G4 TCP	Отсрочка лечения для TCP с клинически значимым кровотечением до тромбоцитов ≥ 75×10 ⁹ /л и разрешения кровотечения.
	Степень 4 фебрильной нейтропении Степень 4 TCP > 5 дней	Прекращение лечения.
	Желудочно-кишечные (колит)	
40	Степень 2	Отсрочка лечения до Степени ≤1 или исходного уровня.
	Степень 3 или 4	Прекращение лечения.
	Легочные (пневмония)	
45	Степень 1	Лечение может продолжаться при строгом последующем клиническом наблюдением
	Степень 2	Отсрочка лечения до разрешения до Степени ≤ 1. При отсутствии разрешения в пределах 2 недель прекращение лечения.
	Степень 3 или 4	Прекращение лечения.
50	Печеночная (AST/ALT или билирубин)	
	Степень 2 ALT или билирубин	Отсрочка лечения до разрешения до Степень ≤1.
	Степень 3 ALT или билирубин	Если ALT ≤ 8×ULN или Билирубин ≤ 5×ULN: Отсрочка лечения. Повторное начало при разрешении до Степени ≤1. Снижение уровня дозы MCS110 1. Если ALT > 8×ULN или Билирубин > 5×ULN:прекращение лечения.
55	Степень 4 AST/ALT или билирубина или Степень 2 билирубина со Степенью 2 AST или ALT	Прекращение лечения.

Повышение СК	
5	Степень 3-4 Мониторинг изофермента СК-МВ, тропонина (I или T) и креатинина. Если СК-МВ и тропонин (I или T) находятся в норме, креатинин $\leq 1,5$ исходный уровень и пациент асимптоматический, продолжение лечения. Если СК-МВ и тропонин (I или T) являются аномальными или креатинин ($> 1,5$ исходный уровень и $> \text{ULN}$) или пациент симптоматический, отсрочка лечения и исследование альтернативных причин повышенного СК (например, миозит и рабдомиолиз) согласно местным инструкциям. После восстановления СК-МВ, тропонина (I или T) и креатинина до Степени 1 или исходного уровня, повторное начало лечения. Снижение уровня дозы MCS110 1.
Почечные (креатинин)	
10	Степень 2 или 3 Отсрочка лечения до разрешения до Степени ≤ 1 или исходного уровня. Степень 4 Прекращение лечения.
Эндокринная	
10	Степень 2 или 3 Отсрочка лечения до $\leq$ Степени 1. Степень 4 Прекращение лечения или обсуждение повторного начала с Novartis после соответствующей заместительной терапии.
Глазная (увеит)	
15	Степень 2 Отсрочка лечения до разрешения до $\leq$ Степени 1. Степень 3 или 4 Прекращение лечения.
Периорбитальный отек	
15	Степень 2 Отсрочка лечения до разрешения до $\leq$ Степени 1. Снижение уровня дозы MCS110 1. Степень 3 Прекращение лечения.
Кожа (сыпь)	
20	Степень 2 Отсрочка лечения при продолжительности > 7 дней. Повторное начало при разрешении до Степени ≤ 1. Степень 3 Отсрочка лечения до разрешения до $\leq$ Степени 1. Снижение уровня дозы MCS110 1. Если АЕ рецидивирует, прекращение лечения. Степень 4 Прекращение лечения.
Сердечная (мио-/перикардит)	
25	Степень 2 Отсрочка лечения до $\leq$ Степени 1. Прекращение лечения в случае рецидива. Степень 3 с продолжительностью > 6 дней или Степень 4 Прекращение лечения.

Пример 2

После части Фазы Ib, если появившиеся данные ФК, ФД и безопасности указывают на то, что стратегия базового дозирования MCS110 является подходящей, тогда стратегию базового дозирования можно осуществлять в части Фазы II исследования.

30 Данные ФК, полученные во время части Фазы Ib этого исследования, будут комбинироваться с данными ФК других клинических исследований MCS110 для оценки базового дозирования в сравнении с дозированием, основанным на массе тела, и базовая доза может быть идентифицирована для части Фазы II этого исследования

Пример 3

35 Данные Rnaseq из базы данных TCGA показывают высокий уровень экспрессии суррогатного маркера для макрофагов M2, CD163, в популяции пациентов, характеризующейся наивысшим уровнем экспрессии PD1. Был предпринят анализ различных типов опухолей, чтобы определить экспрессию CD163 и PD1 у различных типов опухолей. Используя Rnaseq из базы данных TCGA и внутренней базы данных

40 для различных злокачественных новообразований, включающих трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак кожи, рак яичника, злокачественные новообразования поджелудочной железы, глиобластома (GBM), рак легких, почечно-клеточную карциному, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), мезотелиому и назофарингеальную карциному (NPC), наблюдали уровни экспрессии PD-1 по отношению к CD163. ФИГ. 1 показывает взаимосвязь уровней экспрессии PD-1 по отношению к CD163 посредством упорядочивания экспрессии PD-1 от высокой к низкой. Результаты показывают, что высокая экспрессия PD-1, в целом, хорошо коррелирует с высокими уровнями CD163.

Пример 4

Антитело Н-RX1 против М-CSF (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 2), в комбинации с молекулой антитела против PD-1 ВАР049-Клона-Е (молекулой антитела, имеющей переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 12), вводят пациентам с прогрессирующим трижды негативным раком молочной железы (TNBC), которые проходили стандартное лечение. Ответ опухоли определяют местно согласно Критериям оценки ответа солидных опухолей (RECIST) v1.1 (Therasse et al., (2000) New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16); New Guidelines to Evaluate the Response in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16 и пересмотренное руководство RECIST (версия 1.1) (Eisenhauer et al 2009) European Journal of Cancer; 45:228-247.

Пример 5

Антитело Н-RX1 против М-CSF (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 2), в комбинации с молекулой антитела против PD-1 ВАР049-Клона-Е (молекулой антитела, имеющей переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 12) вводят пациентам с раком поджелудочной железы. Ответ опухоли будет определяться местно согласно Критериям оценки ответа солидных опухолей (RECIST) v1.1 (Therasse et al., (2000) New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16); New Guidelines to Evaluate the Response in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16 и пересмотренное руководство RECIST (версия 1.1) (Eisenhauer et al 2009) European Journal of Cancer; 45:228-247.

Пример 6

Антитело Н-RX1 против М-CSF (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 2) в комбинации с молекулой антитела против PD-1 ВАР049-Клона-Е (молекулой антитела, имеющей переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 12), вводят пациентам с карциномой эндометрия. Ответ опухоли будет определяться местно согласно Критериям оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) v1.1 (Therasse et al., (2000) New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16); New Guidelines to Evaluate the Response in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16 и пересмотренное руководство RECIST (версия 1.1) (Eisenhauer et al 2009) European Journal of Cancer; 45:228-247.

Пример 7

Антитело Н-RX1 против М-CSF (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 2) в комбинации с молекулой антитела против PD-1 клона Е (молекулой антитела, имеющей

вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 12) вводят пациентам с меланомой, которые проходили стандартное лечение и являются резистентными к терапии с использованием PD-1 или PD-L1. Ответ опухоли будет определяться местно согласно Критериям оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) v. 1.1 (Therasse et al., (2000) New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16); New Guidelines to Evaluate the Response in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16 и пересмотренное руководство RECIST (версия 1.1) (Eisenhauer et al 2009) European Journal of Cancer; 45:228-247.

Пример 8

Антитело H-RX1 против M-CSF (антитело, имеющее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 2) в комбинации с молекулой антитела против PD-1 BAP049-Клона-Е (молекулой антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 12) вводят пациентам с прогрессирующим трижды негативным раком молочной железы (TNBC), которые проходили стандартное лечение, и, которые являются рефрактерными или резистентными к терапии с использованием PD-1 или PD-L1. Ответ опухоли определяют местно согласно Критериям оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) v1.1 (Therasse et al., (2000) New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16); New Guidelines to Evaluate the Response in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16 и пересмотренное руководство RECIST (версия 1.1) (Eisenhauer et al 2009) European Journal of Cancer; 45:228-247.

Пример 9

Антитело H-RX1 против M-CSF (антитело, имеющее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 4) в комбинации с молекулой антитела против PD-1 BAP049-Клона-Е (молекулой антитела, имеющего вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислоты, приведенные в SEQ ID NO: 47) вводят пациентам с одним или обоими из немелкоклеточного рака легких и плоскоклеточного рака легких. Ответ опухоли будет определяться местно согласно Критериям оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) v1.1 (Therasse et al., (2000) New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16); New Guidelines to Evaluate the Response in Solid Tumors, Journal of National Cancer Institute, Vol. 92; 205-16 и пересмотренное руководство RECIST (версия 1,1) (Eisenhauer et al 2009) European Journal of Cancer; 45:228-247.

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные в настоящем описании, полностью включены в него посредством ссылки. Другие признаки, цели и преимущества изобретения будут понятными из описания и чертежей и из формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> FJAELLSKOG, MARIE-LOUISE
CAMERON, JOHN SCOTT

CAO, ZHU ALEXANDER
 CIPOLLETTA, DANIELA
 MACISAAC, KENZIE DANIEL

<120> НОВАЯ КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ

5 <130> PAT057000

<140>

<141>

<150> 62/352,637

<151> 2016-06-21

10 <150> 62/198,384

<151> 2015-07-29

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

20 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

25 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

30 Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

35 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

40 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

45 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

RU 2 742 494 C2

	210		215		220	
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser					
	225		230		235	240
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg					
5		245		250		255
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro					
		260		265		270
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala					
		275		280		285
10	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val					
		290		295		300
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr					
	305		310		315	320
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr					
15		325		330		335
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu					
		340		345		350
	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys					
		355		360		365
20	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
		370		375		380
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					
	385		390		395	400
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser					
25		405		410		415
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
		420		425		430
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
		435		440		445
30	<210> 2					
	<211> 214					
	<212> PRT					
	<213> Искусственная Последовательность					
	<220>					
35	<221> источник					
	<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"					
	<400> 2					
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly					
	1	5	10	15		
40	Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser					
		20	25	30		
	Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile					
		35	40	45		
	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
45		50	55	60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala					
	65		70	75		80
	Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr					

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 5 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 10 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 15 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 3
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 25 <400> 3
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5
 <210> 4
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 35 <400> 4
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 45 <400> 5
 Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 6

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 6
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
 1 5 10
 10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 7
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5
 20 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 8
 Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr
 1 5
 30 <210> 9
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 9
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 40 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile
 35 40 45
 Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly
 50 55 60
 45 Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn

RU 2 742 494 C2

				85					90				95			
	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
				100					105				110			
5	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Phe	Asp	Tyr	Ala	His	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			115					120					125			
	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			130					135					140			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	145					150					155					160
10	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
				165					170					175		
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			180						185				190			
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
15			195					200					205			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	210					215						220				
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	225					230					235					240
20	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				245					250					255		
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265					270			
25	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			275					280					285			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	290					295					300					
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	305					310					315					320
30	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				325					330					335		
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			340					345					350			
35	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			355					360					365			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	370					375					380					
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	385					390					395					400
40	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				405					410					415		
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			420					425					430			
45	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			435					440					445			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	450					455						460				
	Pro	Gly	Lys													

465
 <210> 10
 <211> 234
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 10

10 Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser
 15 35 40 45
 Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 20 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
 100 105 110
 Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 25 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 30 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 35 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

40 <210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 5 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 10 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 15 115
 <210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 12
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 25 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 30 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
 35 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 13
 40 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 13
 Thr Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 14
 Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe Lys
 10 1 5 10 15
 Asn
 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 15
 20 Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr
 1 5
 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 16
 30 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Thr
 <210> 17
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 40 <400> 17
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"

<400> 18

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

5 <210> 19

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная Последовательность

<220>

10 <221> источник

<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

15 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe

20 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

25 Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

30 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

35 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

40 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

45 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
5 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
10 355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
15 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
20 435 440
<210> 20
<211> 220
<212> PRT
<213> Искусственная Последовательность
25 <220>
<221> источник
<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
<400> 20
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
30 1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
40 85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
45 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
5 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220
<210> 21
10 <211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная Последовательность
<220>
<221> источник
15 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
<400> 21
Thr Tyr Trp Met His
1 5
<210> 22
20 <211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная Последовательность
<220>
<221> источник
25 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
<400> 22
Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asn
30 <210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная Последовательность
<220>
35 <221> источник
<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
<400> 23
Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr
1 5
40 <210> 24
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная Последовательность
<220>
45 <221> источник
<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

RU 2 742 494 C2

1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
15 115
<210> 25
<211> 443
<212> PRT
<213> Искусственная Последовательность
20 <220>
<221> источник
<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
25 1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
30 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35 85 90 95
Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
40 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
45 165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

	195		200		205
	Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro				
	210		215		220
	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe				
5	225		230		235
	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val				
		245		250	255
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe				
		260		265	270
10	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro				
		275		280	285
	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr				
		290		295	300
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val				
15	305		310		315
	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala				
		325		330	335
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln				
		340		345	350
20	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly				
		355		360	365
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro				
		370		375	380
	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser				
25	385		390		395
	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu				
		405		410	415
	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His				
		420		425	430
30	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly				
		435		440	
	<210> 26				
	<211> 17				
	<212> PRT				
35	<213> Искусственная Последовательность				
	<220>				
	<221> источник				
	<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"				
	<400> 26				
40	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu				
	1	5	10	15	
	Thr				
	<210> 27				
	<211> 7				
45	<212> PRT				
	<213> Искусственная Последовательность				
	<220>				
	<221> источник				

<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 27
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 5 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 10 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 28
 Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 15 <210> 29
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 29
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 30 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 35 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 30
 <211> 220
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид"
 45 <400> 30
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

RU 2 742 494 C2

		20		25		30	
		Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln					
		35		40		45	
		Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val					
5		50		55		60	
		Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr					
		65		70		75	80
		Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn					
		85		90		95	
10		Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile					
		100		105		110	
		Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp					
		115		120		125	
		Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn					
15		130		135		140	
		Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu					
		145		150		155	160
		Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp					
		165		170		175	
20		Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr					
		180		185		190	
		Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser					
		195		200		205	
		Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
25		210		215		220	
		<210> 31					
		<211> 19					
		<212> PRT					
		<213> Искусственная Последовательность					
30		<220>					
		<221> источник					
		<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"					
		<400> 31					
		Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser					
35		1	5	10		15	
		Val Gln Ala					
		<210> 32					
		<211> 20					
		<212> PRT					
40		<213> Искусственная Последовательность					
		<220>					
		<221> источник					
		<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"					
		<400> 32					
45		Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr					
		1	5	10		15	
		Gly Thr Arg Cys					
		20					

<210> 33
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 33
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 10 1 5 10 15
 Val Gln Ala
 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 34
 20 Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys
 20
 <210> 35
 25 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 30 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 40 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 45 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

RU 2 742 494 C2

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
5 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
10 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
15 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
20 305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325
<210> 36
<211> 107
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 36
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
30 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
35 50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
40 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
<210> 37
<211> 326
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens
<400> 37
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

RU 2742494 C2

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
5 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
10 85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
15 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
20 165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
25 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
30 245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
35 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly
40 325
<210> 38
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45 <400> 38
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

RU 2 742 494 C2

		20		25		30											
		Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35							40				45				
		Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
5		50					55						60				
		Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
		65					70					75				80	
		Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
					85						90				95		
10		Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
					100					105				110			
		Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
					115				120					125			
		Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
15		130					135						140				
		Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		145					150					155				160	
		Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
					165						170				175		
20		Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
					180					185				190			
		His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
					195				200					205			
		Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
25		210					215						220				
		Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
		225					230					235				240	
		Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
					245						250				255		
30		Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
					260					265				270			
		Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
					275				280					285			
		Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
35		290					295						300				
		Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		305					310					315				320	
		Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
					325						330						
40		<210>	39														
		<211>	330														
		<212>	PRT														
		<213>	Homo sapiens														
		<400>	39														
45		Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
		1			5					10					15		
		Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
					20					25					30		

RU 2742494 C2

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 5 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 10 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 15 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 20 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 25 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 30 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 35 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 40
 40 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 45 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

RU 2742494 C2

	35		40		45												
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50						55						60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
5	65					70					75					80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
					85						90				95		
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100						105				110			
10	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115						120					125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
	130						135					140					
	Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
15	145					150					155					160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165						170					175		
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185				190				
20	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195						200					205				
	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210						215					220					
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
25	225					230					235					240	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245						250					255		
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265				270				
30	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275						280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290						295					300					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
35	305					310					315					320	
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				325						330							
	<210>	41															
	<211>	330															
40	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	41															
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1			5					10					15			
45	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
		20							25					30			
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35						40					45				

RU 2 742 494 C2

	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60					
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70				75					80	
5	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
						85			90						95	
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
						100			105						110	
	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
10						115			120						125	
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135						140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	145					150					155					160
15	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
						165					170				175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
						180			185						190	
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
20						195			200				205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215						220				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235					240
25	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
						245					250				255	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
						260			265						270	
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
30						275			280				285			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295						300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	305					310					315					320
35	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
						325				330						
	<210> 42															
	<211> 8															
	<212> PRT															
40	<213> Искусственная Последовательность															
	<220>															
	<221> источник															
	<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"															
	<400> 42															
45	Arg	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Pro	Asn								
	1					5										
	<210> 43															
	<211> 8															

<212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 43
 Arg Phe Arg Asp Asn Thr Ala Asn
 1 5
 <210> 44
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 44
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu
 1 5
 <210> 45
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 45
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 46
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 46
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 <210> 47
 40 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"
 <400> 47
 gctgacagac taacagactg ttcc
 <210> 48

<211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>

5 <221> источник

<223> /замечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 48

caaatgtggt atggctga

18

10 (57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая комбинация для лечения злокачественного новообразования, содержащая:

i) изолированную молекулу антитела, способную к связыванию с человеческим белком программируемой смерти типа 1 (PD-1), содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1 с SEQ ID NO: 21, аминокислотную последовательность VHCDR2 с SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность VHCDR3 с SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1 с SEQ ID NO: 26, аминокислотную последовательность VLCDR2 с SEQ ID NO: 27 и аминокислотную последовательность VLCDR3 с SEQ ID NO: 28; и

ii) изолированную молекулу антитела, способную к связыванию с макрофагальным колониестимулирующим фактором 1 (M-CSF), содержащую (а) VH, содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1 с SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность VHCDR2 с SEQ ID NO: 4 и аминокислотную последовательность VHCDR3 с SEQ ID NO: 5; и VL, содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1 с SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность VLCDR2 с SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VLCDR3 с SEQ ID NO: 8.

2. Фармацевтическая комбинация по п. 1, где антитело против PD-1 по п. 1 содержит:

(а) VH, содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1 с SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность VHCDR2 с SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность VHCDR3 с SEQ ID NO: 15; и VL, содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1 с SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность VLCDR2 с SEQ ID NO: 17, и аминокислотную последовательность VLCDR3 с SEQ ID NO: 18;

(b) VH, содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную с SEQ ID NO: 21; аминокислотную последовательность VHCDR2 с SEQ ID NO: 22; и аминокислотную последовательность VHCDR3 с SEQ ID NO: 23; и VL, содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1 с SEQ ID NO: 26, аминокислотную последовательность VLCDR2 с SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность VLCDR3 с SEQ ID NO: 28;

(с) VH, содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1 с SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VHCDR2 с SEQ ID NO: 32, и аминокислотную последовательность VHCDR3 с SEQ ID NO: 33; и VL, содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1 с SEQ ID NO: 41, аминокислотную последовательность VLCDR2 с SEQ ID NO: 42, и аминокислотную последовательность VLCDR3 с SEQ ID NO: 43; или

(d) VH, содержащую аминокислотную последовательность VHCDR1 с SEQ ID NO: 34; аминокислотную последовательность VHCDR2 с SEQ ID NO: 35; и аминокислотную

последовательность VHCDR3 с SEQ ID NO: 36; и VL, содержащую аминокислотную последовательность VLCDR1 с SEQ ID NO: 44, аминокислотную последовательность VLCDR2 с SEQ ID NO: 45, и аминокислотную последовательность VLCDR3 с SEQ ID NO: 46.

3. Фармацевтическая комбинация по п. 1, содержащая молекулу антитела против PD-1 или молекулу антитела против M-CSF отдельно или вместе.
4. Фармацевтическая комбинация по п. 1 или 2 для применения в качестве лекарственного средства, где молекулу антитела против PD-1 и молекулу антитела против M-CSF вводят независимо в одно и то же время или отдельно в пределах временных интервалов.
5. Фармацевтическая комбинация по п. 4, где временные интервалы обеспечивают активность партнеров комбинации.
6. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, содержащая количество, которое является терапевтически эффективным для лечения трижды негативного рака молочной железы.
7. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, содержащая количество, которое является терапевтически эффективным для лечения рака яичника.
8. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, содержащая количество, которое является терапевтически эффективным для лечения меланомы.
9. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, содержащая количество, которое является терапевтически эффективным для лечения рака поджелудочной железы.
10. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, содержащая количество, которое является терапевтически эффективным для лечения злокачественного новообразования, которое стало резистентным или рефрактерным к терапии с использованием PD-1 или PD-L1.
11. Фармацевтическая комбинация по п. 10, где злокачественное новообразование представляет собой TNBC или меланому.
12. Способ лечения рака молочной железы, включающий введение эффективного количества комбинации по любому из пп. 1-5 нуждающемуся в этом субъекту.
13. Способ лечения рака яичника, включающий введение эффективного количества комбинации по любому из пп. 1-5 нуждающемуся в этом субъекту.
14. Способ лечения рака поджелудочной железы, включающий введение эффективного количества комбинации по любому из пп. 1-5 нуждающемуся в этом субъекту.
15. Способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение эффективного количества комбинации по любому из пп. 1-5 нуждающемуся в этом субъекту, где злокачественное новообразование является резистентным или рефрактерным к терапии с использованием PD-1 или PD-L1.
16. Способ по п. 15, где злокачественное новообразование представляет собой TNBC.
17. Способ по п. 15, где злокачественное новообразование представляет собой меланому.
18. Способ по пп. 15-17, где молекула антитела против PD-1 и молекула антитела против M-CSF вводят одновременно или последовательно.
19. Способ по пп. 15-17, способ, дополнительно включающий химиотерапевтическое средство.

