



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130968** (13) **C2**
(51) МПК (2026.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2021 00163	(72) Винахідник(и): Корнфелд Марк (US), Пандя Наїміш Бхарат (US), Віргінтон Джон Марк (US), Ла Мотте-Мос Росс (US), Самроу Бредлі Джеймс (US)
(22) Дата подання заявки:	18.06.2019	(73) Володілець (володільці): ІНСАЙТ КОРПОРЕЙШН, 1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, Delaware 19803, United States of America (US), МАКРОДЖЕНІКС, ІНК., 9704 Medical Center Drive, Rockville, Maryland 20850, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	02.07.2026	(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/687,673, 62/756,319	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2017/019846 A1, 02.02.2017 Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Advanced Programmed Death Ligand 1-Positive Endometrial Cancer: Results From the KEYNOTE-028 Study / P. A. OTT et al. // Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. 2017. Vol. 35, No. 22. P. 2535–2541 Complete Remission Following Pembrolizumab in a Woman with Mismatch Repair-Deficient Endometrial Cancer and a Germline BRCA1 Mutation / S. D. DIZON et al. // The Oncologist. 2018. Vol. 23, No. 6. P. 650–653 Regression of Chemotherapy-Resistant Polymerase (POLE) Ultra-Mutated and MSH6 Hyper-Mutated Endometrial Tumors with Nivolumab / A. D. SANTIN et al. // Clinical Cancer Research. 2016. Vol. 22, No. 23. P. 5682–5687 Immune Activation and Response to Pembrolizumab in POLE-Mutant Endometrial Cancer / J. M. MEHNERT et al. // The Journal of Clinical Investigation. 2016. Vol. 126, No. 6. P. 2334–2340 New Therapies for Advanced, Recurrent, and Metastatic Endometrial Cancers / V. MAKKER et al. // Gynecologic Oncology Research and Practice. 2017. Vol. 4. P. 19 Nivolumab for Previously Treated Unresectable Metastatic Anal Cancer (NCI9673): A Multicentre, Single-Arm, Phase 2 Study / V. K. MORRIS et al. // The Lancet Oncology. 2017. Vol. 18, No. 4. P. 446–453 Safety and Antitumor Activity of the Anti-PD-1 Antibody Pembrolizumab in Patients with Recurrent Carcinoma of the Anal Canal / P. A. OTT et al. // Annals of Oncology. 2017. Vol. 28, No. 5. P. 1036–1041 Systemic Therapies for Advanced Squamous Cell Anal Cancer / F. SCLAFANI et al. // Current Oncology Reports. 2018. Vol. 20, No. 7. P. 1–11
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	20.06.2018, 06.11.2018	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку:	24.03.2021, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	01.07.2026, Бюл.№ 26	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2019/037750, 18.06.2019	

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ КАРЦИНОМИ З КЛІТИН МЕРКЕЛЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування карциноми з клітин Меркеля у суб'єкта-людини, який потребує цього, причому спосіб включає введення суб'єкту-людині терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з PD-1 людини.

UA 130968 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ ДО СПОРІДНЕНИХ ЗАЯВОК

Ця заявка вистребує пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 62/687673, поданою 20 червня 2018 р., і за попередньою заявкою на патент США № 62/756319, поданою 6 листопада 2018 р. Вміст попередніх заявок повністю включений у цей документ шляхом посилавання.

Рівень техніки

Деякі пацієнти зі злоякісним новоутворенням, включно з раком ендометрію, карциномою з клітин Меркеля і раком анального каналу, мають поганий довгостроковий прогноз. Для цих злоякісних новоутворень необхідні додаткові і нові способи лікування, особливо для тих пацієнтів, у яких розвивається метастатичне захворювання.

Сутність винаходу

В одному аспекті опис стосується способу лікування раку ендометрію (наприклад, метастатичного раку ендометрію) у суб'єкта-людини, який потребує цього, при цьому спосіб включає введення суб'єкту-людині терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке зв'язується з PD-1 людини, причому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH), що містить область (CDR)1 VH, CDR2 VH і CDR3 VH, що визначає комплементарність, при цьому:

CDR1 VH містить амінокислотну послідовність SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH містить амінокислотну послідовність VIHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); і

CDR3 VH містить амінокислотну послідовність EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); і

в якому антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що містить CDR1 VL, CDR2 VL і CDR3 VL, при цьому:

CDR1 VL містить амінокислотну послідовність RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL містить амінокислотну послідовність AASNQGS (SEQ ID NO: 10); і

CDR3 VL містить амінокислотну послідовність QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

У деяких варіантах здійснення рак ендометрію являє собою рак ендометрію з високою мікросателітною нестабільністю (MSI-H) (наприклад, метастатичний рак ендометрію з MSI-H).

У деяких варіантах здійснення рак ендометрію являє собою рак ендометрію з дефіцитом корекції неспарених основ (dMMR) (наприклад, метастатичний рак ендометрію з dMMR).

У деяких варіантах здійснення рак ендометрію являє собою позитивний за мутацією в екзонуклеазному домені ДНК-полімерази ϵ (POLE) рак ендометрію (наприклад, позитивний за мутацією в екзонуклеазному домені POLE метастатичний рак ендометрію).

В іншому аспекті опис стосується способу лікування карциноми з клітин Меркеля (наприклад, метастатичної карциноми з клітин Меркеля) у суб'єкта-людини, який потребує цього, при цьому спосіб включає введення суб'єкту-людині терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке зв'язується з PD-1 людини, причому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить домен VH, що містить CDR1 VH, CDR2 VH і CDR3 VH, при цьому:

CDR1 VH містить амінокислотну послідовність SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH містить амінокислотну послідовність VIHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); і

CDR3 VH містить амінокислотну послідовність EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); і

в якому антитіло містить домен VL, що містить CDR1 VL, CDR2 VL і CDR3 VL, при цьому:

CDR1 VL містить амінокислотну послідовність RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL містить амінокислотну послідовність AASNQGS (SEQ ID NO: 10); і

CDR3 VL містить амінокислотну послідовність QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

В іншому аспекті опис стосується способу лікування раку анального каналу (наприклад, метастатичного раку анального каналу) у суб'єкта-людини, який потребує цього, при цьому спосіб включає введення суб'єкту-людині терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке зв'язується з PD-1 людини, причому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить домен VH, що містить CDR1 VH, CDR2 VH і CDR3 VH, при цьому:

CDR1 VH містить амінокислотну послідовність SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH містить амінокислотну послідовність VIHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); і

CDR3 VH містить амінокислотну послідовність EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); і

в якому антитіло містить домен VL, що містить CDR1 VL, CDR2 VL і CDR3 VL, при цьому:

CDR1 VL містить амінокислотну послідовність RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL містить амінокислотну послідовність AASNQGS (SEQ ID NO: 10); і

CDR3 VL містить амінокислотну послідовність QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

У деяких варіантах здійснення рак анального каналу являє собою плоскоклітинну карциному анального каналу (SCAC) (наприклад, метастатичну SCAC).

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять в дозі близько 1 мг/кг один раз на 2 тижні.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять в дозі близько 3 мг/кг один раз на 2 тижні.

5 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять в дозі близько 3 мг/кг один раз на 4 тижні.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять в дозі близько 10 мг/кг один раз на 2 тижні.

10 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять в дозі близько 10 мг/кг один раз на 4 тижні.

В іншому аспекті опис стосується способу лікування злоякісного новоутворення у суб'єкта-людини, який потребує цього, причому спосіб включає введення суб'єкту-людині терапевтично ефективної фіксованої дози антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке зв'язується з PD-1 людини, при цьому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить домен VH, що містить VH CDR1, VH CDR2 і VH CDR3, при цьому:

CDR1 VH містить амінокислотну послідовність SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH містить амінокислотну послідовність VIHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); і

CDR3 VH містить амінокислотну послідовність EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); і

в якому антитіло містить домен VL, що містить CDR1 VL, CDR2 VL і CDR3 VL, при цьому:

20 CDR1 VL містить амінокислотну послідовність RASEVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL містить амінокислотну послідовність AASNQGS (SEQ ID NO: 10); і

CDR3 VL містить амінокислотну послідовність QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

У деяких варіантах здійснення таких способів лікування злоякісного новоутворення, які включають введення терапевтично ефективної фіксованої дози, причому злоякісне новоутворення являє собою рак анального каналу, рак сечового міхура, рак молочної залози, колоректальний рак, рак ендометрію, гепатоцелюлярну карциному, гліому, рак нирки, рак легені, карциному з клітин Меркеля, множинну мієлому, нейробластоми, неходжкінську лімфому, недрібноклітинний рак легені, рак яєчників, рак підшлункової залози, рак прямої кишки або саркому.

30 У деяких варіантах здійснення таких способів лікування злоякісного новоутворення, що включають введення терапевтично ефективної фіксованої дози, причому злоякісне новоутворення являє собою рак ендометрію (наприклад, недиференційований рак ендометрію, рак ендометрію з високою MSI, рак ендометрію з dMMR або позитивний за мутацією в екзонуклеазному домені POLE рак ендометрію), саркому м'яких тканин, недрібноклітинний рак легені (НМРЛ) або рак шийки матки.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять у фіксованій дозі близько 375 мг один раз на 3 тижні.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять у фіксованій дозі близько 500 мг один раз на 4 тижні.

40 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять у фіксованій дозі близько 750 мг один раз на 4 тижні.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів домен VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4.

45 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло містить важкий ланцюг, і при цьому важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів домен VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5.

50 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло містить легкий ланцюг, і при цьому легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів домен VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, а домен VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5.

55 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, і при цьому важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, а легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3.

60 У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло являє собою гуманізоване антитіло.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антигензв'язувальний фрагмент являє собою однокланове антитіло, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scFv, sc(Fv)₂ або діатіло.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з вищевказаних аспектів антитіло або антигензв'язувальний фрагмент вводять внутрішньовенно.

Якщо не вказано інше, всі вживані в цьому документі технічні та наукові терміни мають те саме значення, яке зазвичай мається на увазі середнім фахівцем в області техніки, до якої належить цей винахід. Хоча способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні тим, які описуються в цьому документі, можуть застосовуватися на практиці або під час випробування цього винаходу, ілюстративні способи і матеріали описані нижче. Усі публікації, заявки на патенти, патенти та інші посилання, що згадуються в цьому документі, включені за допомогою посилання в усій своїй повноті. У випадку суперечності ця заявка, яка включає визначення, матиме переважну силу. Матеріали, способи і приклади є виключно ілюстративними і не мають обмежувального характеру.

Інші ознаки і переваги цього винаходу будуть очевидними з подальшого докладного опису і з формули винаходу.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

Описані в цьому документі антитіла до PD-1 можуть застосовуватися для лікування раку ендометрію, карциноми з клітин Меркеля і раку анального каналу.

PD-1

Білок запрограмованої клітинної загибелі-1 (PD-1, також відомий як CD279) являє собою мембранний білок типу I розміром приблизно 31 кДа, член розширеного сімейства CD28/CTLA-4 регуляторів Т-клітин, який в широкому сенсі негативно регулює імунні відповіді (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death " EMBO J. 11:3887-3895; публікація патентної заявки США № 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; патенти США №№ 6808710; 7101550; 7488802; 7635757; 7722868; публікація PCT № WO 01/14557).

PD-1 експресується на активованих Т-клітинах, В-клітинах і моноцитах (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes, " Int. Immunol. 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC " J. Immunol. 169:5538-5545) і на низьких рівнях у натуральних кілерних (NK) Т-клітинах (Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice " J. Exp. Med. 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity " Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298).

Позаклітинна область PD-1 складається з одного домену імуноглобуліну (Ig) V з 23 % ідентичністю еквівалентному домену в CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity " Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). За позаклітинним доменом IgV йдуть трансмембранна область і внутрішньоклітинний хвіст. Внутрішньоклітинний хвіст містить два сайти фосфорилування, розташовані в імунорецепторному тирозиновому інгібуючому мотиві та імунорецепторному тирозиновому інгібуючому мотиві переключення, який передбачає, що PD-1 негативно регулює сигнали TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death, " EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer, " Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

PD-1 опосередковує пригнічення імунної системи шляхом зв'язування з B7-H1 і B7-DC (Flies, DB et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity " J. Immunother. 30(3):251-260; патенти США № 6803192; 7794710; публікації патентних заявок США № 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; публікації PCT № WO 01/39722; WO 02/086083).

Амінокислотна послідовність білка PD-1 людини (номер доступу в Genbank NP_005009) являє собою:
 MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN
 WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPK
 AQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGT
 IGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRG
 SADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1).

Антитіла до PD-1

Цей опис включає послідовності моноклонального антитіла, антитіла X, гуманізованого моноклонального антитіла IgG4, яке зв'язується з PD-1 людини. Див. мкАТ 7 (1.2) до hPD-1 в

WO2017019846 і US 2019/0127467, вміст яких включено шляхом посилання. Амінокислотні послідовності зрілих важкого та легкого ланцюгів антитіла X показані нижче. Области (CDR) 1, 2 і 3, що визначають компліментарність, варіабельного домену важкого ланцюга (VH) і варіабельного домену легкого ланцюга (VL) показані в такому порядку від N- до C-кінця зрілих послідовностей VL і VH і підкреслені та виділені жирним шрифтом. Антитіло, яке складається зі зрілого важкого ланцюга (SEQ ID NO: 2 та зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 3), наведених нижче, позначають антитілом X.

Зрілий важкий ланцюг (HC) антитіла X

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGVIHPSDSETWLDQ
KFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAREHYGTSPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTIKAKAQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHENHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:2)

Зрілий легкий ланцюг (LC) антитіла X

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGMSFMNWFQQKPGQPPKLLIHAASNQGSQGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYFCQQSKEVPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Варіабельний домен важкого ланцюга (VH) антитіла X має таку амінокислотну послідовність:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGVIHPSDSETWLDQ
KFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAREHYGTSPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:4)

Варіабельний домен легкого ланцюга (VL) антитіла X має таку амінокислотну послідовність:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGMSFMNWFQQKPGQPPKLLIHAASNQGSQGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYFCQQSKEVPYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:5)

Амінокислотні послідовності CDR VH антитіла X перераховані нижче:

CDR1 VH: SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH: VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO:7);

CDR3 VH: EHYGTSPFAY (SEQ ID NO:8)

Амінокислотні послідовності CDR VL антитіла X перераховані нижче:

CDR1 VL: RASESDNYGMSFMNW (SEQ ID NO:9);

CDR2 VL: AASNQGS (SEQ ID NO:10); і

CDR3 VL: QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11).

У певних варіантах здійснення антитіло до PD-1 містить константну область важкого ланцюга і легкого ланцюга людини. У певних варіантах здійснення константна область важкого ланцюга містить домен CH1 і шарнірну область. У деяких варіантах здійснення константна область важкого ланцюга містить домен CH2. У деяких варіантах здійснення константна область важкого ланцюга містить домен CH3. У деяких варіантах здійснення константна область важкого ланцюга містить домени CH1, CH2 і CH3. Якщо константна область важкого ланцюга містить заміни, то такі заміни модифікують властивості антитіла (наприклад, збільшують або зменшують одне або більше зі: зв'язування Fc-рецептора, глікозилювання антитіла, числа залишків цистеїну, функції ефекторних клітин або функції комплементу). У деяких варіантах здійснення антитіло являє собою антитіло IgG. У конкретних варіантах здійснення антитіло вибрано з групи, що складається з IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4.

Антитіла, наприклад, антитіло X, можуть бути створені, наприклад, шляхом отримання і експресування синтетичних генів, які кодують зазначені амінокислотні послідовності, або шляхом мутації генів зародкової лінії людини для отримання гену, який кодує зазначені амінокислотні послідовності. Більше того, це антитіло та інші антитіла до PD-1 можна отримати, наприклад, з використанням одного або більше з наступних способів.

Гуманізовані антитіла можуть бути отримані шляхом заміни послідовностей варіабельної ділянки Fv, які безпосередньо не беруть участь у зв'язуванні антигену, на еквівалентні послідовності з варіабельних ділянок Fv людини. Загальні способи створення гуманізованих антитіл надані в Morrison, S. L., Science, 229:1202-1207 (1985), Oi et al., BioTechniques, 4:214 (1986), і в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; и US 6407213. Ці способи включають виділення, маніпулювання і експресію послідовностей нуклеїнових кислот, які кодують всі або частину варіабельних ділянок Fv імуноглобуліну щонайменше з одного важкого або легкого ланцюга. Джерела такої нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям у цій області техніки і, наприклад, можуть бути отримані з гібридами, яка продукує антитіло проти заздалегідь визначеної мішені, як описано вище, з генів імуноглобуліну зародкової лінії або з синтетичних

конструкцій. Рекомбінантну ДНК, яка кодує молекулу гуманізоване антитіло, можна потім клонувати у відповідний вектор експресії.

Послідовності зародкової лінії людини, наприклад, описані в Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today*, 16: 237-242 (1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.* 227:799-817 (1992); і Tomlinson et al., *EMBO J.*, 14:4628-4638 (1995). Каталог V BASE надає повний каталог послідовностей варіабельної ділянки імуноглобуліну людини (складений Tomlinson, I.A. et al. Центр досліджень білків MRC, Кембридж, Велика Британія). Такі послідовності можуть бути використані в якості джерела послідовності людини, наприклад, для каркасних областей і CDR. Також можуть бути використані консенсусні каркасні області людини, наприклад, як описано в патенті США № 6300064.

Також можна використовувати інші способи гуманізації антитіл. Наприклад, інші способи можуть враховувати тривимірну структуру антитіла, положення каркаса, які знаходяться в тривимірній близькості до детермінант зв'язування, та імуногенні пептидні послідовності. Див., наприклад, WO 90/07861; патенти США №№ 5693762; 5693761; 5585089; 5530101; і 6407213; Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9:266-271. Ще один спосіб називається як "гуманіринг" і описаний, наприклад, у US 2005-008625.

Антитіло може містити Fc-ділянку людини, наприклад, Fc-ділянку дикого типу або Fc-ділянку, яка містить одну або більше змін. В одному варіанті здійснення константну область змінюють, наприклад, піддають мутації, для модифікації властивостей антитіла (наприклад, для збільшення або зменшення одного або більше зі: зв'язування Fc-рецептора, глікозилювання антитіла, числа залишків цистеїну, функції ефektorних клітин або функції комплементу). Наприклад, константна область IgG1 людини може бути мутувана за одним або більше залишками, наприклад, одним або більше із залишків 234 і 237 (на основі нумерації за Kabat). Антитіла можуть мати мутації в області CH2 важкого ланцюга, які знижують або змінюють ефektorну функцію, наприклад зв'язування Fc-рецептора і активацію комплементу. Наприклад, антитіла можуть мати мутації, як-от описані в патентах США 5624821 і 5648260. Антитіла також можуть мати мутації, які стабілізують дисульфідний зв'язок між двома важкими ланцюгами імуноглобуліну, як-от мутації в шарнірній ділянці IgG4, як описано в цій області техніки (наприклад, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08). Див. також, наприклад, U.S. 2005-0037000.

Антитіла до PD-1 можуть бути в формі повнорозмірних антитіл або в формі низькомолекулярних форм (наприклад, біологічно активних фрагментів антитіл або мініантитіл) антитіл до PD-1, наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, scFv і sc(Fv)₂. Інші антитіла до PD-1, які охоплюються цим описом, включають ододоменне антитіло (одАт), що містить один варіабельний ланцюг, як-от VH або VL, або їх біологічно активний фрагмент. Див., наприклад, Moller et al., *J. Biol. Chem.*, 285(49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77(1):13-22 (2007); U.S. 2005/0079574 і Davies et al. (1996) *Protein Eng.*, 9(6):531-7. Як і повне антитіло, одАт здатне вибірково зв'язуватися зі специфічним антигеном. При молекулярній масі всього 12–15 кДа одАт набагато менше за звичайні антитіла і навіть менше за фрагменти Fab і одноланцюгові варіабельні фрагменти.

У цьому документі запропоновані композиції, що містять суміш антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента і одного або більше його кислотних варіантів, наприклад, де кількість кислотного варіанту (-ів) становить менше близько 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % або 1 %. Також запропоновані композиції, що містять антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент, що містить щонайменше один сайт дезамідування, при цьому рН композиції становить від близько 5,0 до близько 6,5, так що, наприклад, щонайменше близько 90 % антитіл до PD-1 не дезамідовано (тобто дезамідовано менше близько 10 % антитіл). У певних варіантах дезамідовано менше близько 5 %, 3 %, 2 % або 1 % антитіл. рН може становити від 5,0 до 6,0, наприклад, 5,5 або 6,0. У певних варіантах здійснення рН композиції складає 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 або 6,5.

"Кислотний варіант" являє собою варіант поліпептиду, що становить інтерес. який є більш кислим (наприклад, як визначено за допомогою катіонообмінної хроматографії), ніж поліпептид, що становить інтерес. Прикладом кислотного варіанту є дезамідований варіант.

"Дезамідований" варіант молекули поліпептиду являє собою поліпептид, в якому один або більше залишків аспарагіну вихідного поліпептиду були перетворені на аспартат, тобто нейтральний бічний амідний ланцюг був перетворений на залишок із загальними кислотними властивостями.

Термін "суміш", який використовується в цьому документі відносно композиції, що містить антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент, означає присутність як бажаного антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента, так і одного або більше їх

кислотних варіантів. Кислотні варіанти можуть включати переважно дезамідоване антитіло до PD-1 з невеликими кількостями іншого кислотного варіанту (-iv).

У певних варіантах здійснення афінність зв'язування (K_D), швидкість асоціації (K_{on}) та/або швидкість дисоціації (K_{off}) антитіла, яке було мутоване для усунення дезамідування, аналогічна такій для антитіла дикого типу, наприклад, з різницею менше ніж у близько 5 разів, 2 рази, 1 раз (100 %), 50 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % або 1 %.

Фрагменти антитіл

Фрагменти антитіл (наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab_b, і Fv) можуть бути отримані за допомогою протеолітичного розщеплення інтактних антитіл. Наприклад, фрагменти антитіла можна отримати шляхом обробки повного антитіла ферментом, як-от папаїн, пепсин або плазмін. Розщеплення повних антитіл папаїном призводить до утворення фрагментів F(ab)₂ або Fab; розщеплення повних антитіл пепсином призводить до утворення F(ab')₂ або Fab'; і розщеплення повних антитіл плазміном призводить до утворення фрагментів Fab_b.

Альтернативно, фрагменти антитіл можна отримати рекомбінантно. Наприклад, нуклеїнові кислоти, які кодуєть фрагменти антитіл, що становлять інтерес, можуть бути сконструйовані, введені в вектор експресії та експресовані у придатних клітинах-господарях. Див., наприклад, Co, M.S. et al., *J. Immunol.*, 152:2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. and Skerra, A., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., *Methods in Enzymology*, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology*, (1989) 121:663-669 (1989); і Bird, R.E. et al., *TIBTECH*, 9:132-137 (1991)). Фрагменти антитіл можуть бути експресовані та секретовані з *E. coli*, забезпечуючи таким чином легке отримання великих кількостей цих фрагментів. Фрагменти антитіл можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл. В альтернативному варіанті фрагменти Fab'-SH можна виділяти безпосередньо з *E. coli* і хімічно зв'язувати з утворенням фрагментів F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). Згідно з іншим підходом фрагменти F(ab')₂ можна виділяти безпосередньо з культури рекомбінантних клітин-господарів. Фрагменти Fab і F(ab')₂ з підвищеним *in vivo* часом напівжиття, що містять залишки епітопу зв'язування рецептора реутилізації, описані в патенті США № 5869046.

Мініантитіла

Мініантитіла з антитіл до PD-1 включають діатіла, одноланцюгові (scFv) і одноланцюгові (Fv)₂ (sc(Fv)₂).

"Діатіло" являє собою двовалентне мініантитіло, сконструйоване шляхом злиття генів (див., наприклад, Holliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:6444-6448 (1993); EP 404097; WO 93/11161). Діатела являють собою димери, що складаються з двох поліпептидних ланцюгів. Домени VL і VH кожного поліпептидного ланцюга діатіла зв'язані лінкерами. Число амінокислотних залишків, які складають лінкер, може становити від 2 до 12 залишків (наприклад, 3–10 залишків, або п'ять, або близько п'яти залишків). Лінкери поліпептидів у діатілі зазвичай занадто короткі, щоб дозволити VL і VH зв'язуватися один з одним. Таким чином, VL і VH, які кодується одним і тим самим поліпептидним ланцюгом, не можуть утворювати одноланцюговий варіабельний фрагмент, а замість цього утворюють димер з іншим одноланцюговим варіабельним фрагментом. У результаті у діатіла є два антигензв'язувальних сайти.

ScFv являє собою одноланцюгове поліпептидне антитіло, отримане шляхом зв'язування VH і VL лінкером (див., наприклад, Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:5879-5883 (1988); and Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Ed Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). Порядок з'єднання VH і VL не дуже обмежений, і вони можуть бути розташовані в будь-якому порядку. Приклади розташування включають: [VH] лінкер [VL]; або [VL] лінкер [VH]. V-ділянка H-ланцюга і V-ділянка L-ланцюга в scFv можуть бути отримані з будь-якого антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента, описаного в цьому документі.

sc(Fv)₂ являє собою мініантитіло, в якому два VH і два VL з'єднані лінкером з утворенням єдиного ланцюга (Hudson, et al., *J. Immunol. Methods*, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)₂ можна отримати, наприклад, шляхом з'єднання scFv з лінкером. sc(Fv)₂ за цим винаходом включають антитіла, переважно в яких два VH і два VL розташовані в такому порядку: VH, VL, VH і VL ([VH] лінкер [VL] лінкер [VH] лінкер [VL]), починаючи з N-кінця одноланцюгового поліпептиду; однак порядок двох VH і двох VL не обмежений вищевказаною схемою, і вони можуть бути розташовані в будь-якому порядку.

Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла являють собою антитіла, які мають специфічність зв'язування з щонайменше двома різними сайтами. Ілюстративні біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з

двома різними епітопами білка PD-1. Інші такі антитіла можуть поєднувати сайт зв'язування PD-1 із сайтом зв'язування іншого білка. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді повнорозмірних антитіл або їх низькомолекулярних форм (наприклад, біспецифічні антитіла у вигляді $F(ab')_2$, біспецифічні антитіла у вигляді $sc(Fv)_2$, біспецифічні антитіла у вигляді діатіла).

Традиційне отримання повнорозмірних біспецифічних антитіл засноване на коекспресії двох пар важкий ланцюг–легкий ланцюг імуноглобуліну, причому два ланцюги мають різні специфічності (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). В іншому підході варіабельні домени антитіл із бажаною специфічністю зв'язування зливають з послідовностями константних доменів імуноглобуліну. ДНК, які кодують гібриди важкого ланцюга імуноглобуліну і, за бажанням, легкого ланцюга імуноглобуліну, вставляють в окремі вектори експресії і спільно трансфікують в придатну клітину-господар. Це забезпечує більшу гнучкість в регулюванні пропорцій трьох поліпептидних фрагментів. Однак можливо вставити кодуючі послідовності для двох або всіх трьох поліпептидних ланцюгів в один вектор експресії, коли щонайменше два поліпептидні ланцюги експресуються в рівних співвідношеннях, призводить до високих виходів.

Згідно з іншим підходом, описаним у патенті США № US 5731168, поверхня взаємодії між парною молекулою антитіл може бути сконструйована таким чином, щоб максимально збільшити відсоток гетеродимерів, вилучених із культури рекомбінантних клітин. Переважна поверхня взаємодії містить щонайменше частину домену C_{H3} . У цьому способі один або більше невеликих бічних ланцюгів амінокислот від поверхні взаємодії першої молекули антитіла замінюють більшими бічними ланцюгами (наприклад, тирозином або триптофаном). Компенсуючі "порожнини" ідентичного або схожого розміру з великим бічним ланцюгом (-ами) створюються на поверхні взаємодії другої молекули антитіла шляхом заміни більших бічних ланцюгів амінокислот меншими (наприклад, аланіном або треоніном). Це забезпечує механізм збільшення виходу гетеродимеру в порівнянні з іншими небажаними кінцевими продуктами, як-от гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають зшиті або "гетерокон'югатні" антитіла. Наприклад, одне з антитіл в гетерокон'югаті може бути зв'язано з авідином, інше — з біотином. Гетерокон'югатні антитіла можна отримати з використанням будь-яких зручних способів зшивання.

Технологія "діатіл" забезпечує альтернативний механізм отримання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти містять VH, з'єднаний з VL лінкером, який занадто короткий, щоб забезпечити об'єднання двох доменів в одному ланцюзі. Відповідно, домени VH і VL одного фрагмента змушені об'єднуватися з комплементарними доменами VL і VH іншого фрагмента, тим самим утворюючи два антигензв'язувальні сайти.

Мультивалентні антитіла

Мультивалентне антитіло може бути інтерналізоване (та/або катаболізоване) клітиною, що експресує антиген, з яким зв'язуються антитіла, швидше, ніж бівалентне антитіло. Описані в цьому документі антитіла можуть бути мультивалентними антитілами з трьома або більше сайтами зв'язування антигену (наприклад, чотиривалентними антитілами), які можуть бути легко отримані шляхом експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептидні ланцюги антитіла. Мультивалентне антитіло може містити домен димеризації й три або більше антигензв'язувальних сайтів. Ілюстративний домен димеризації містить (або складається з) Fc-ділянку або шарнірну ділянку. Мультивалентне антитіло може містити (або складатися з) від трьох до близько восьми (наприклад, чотирьох) сайтів зв'язування антигену. Мультивалентне антитіло необов'язково містить щонайменше один поліпептидний ланцюг (наприклад, щонайменше два поліпептидні ланцюги), де поліпептидний ланцюг (-и) містить два або більше варіабельних доменів. Наприклад, поліпептидний ланцюг (-и) може містити $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, де VD1 являє собою перший варіабельний домен, VD2 являє собою другий варіабельний домен, Fc являє собою поліпептидний ланцюг Fc-області, X1 і X2 являють собою амінокислотний або пептидний спейсер, а n дорівнює 0 або 1.

Кон'юговані антитіла

Описані в цьому документі антитіла можуть являти собою кон'юговані антитіла, які зв'язані з різними молекулами, включно з макромолекулярними речовинами, як-от полімери (наприклад, поліетиленгліколь (PEG), поліетиленімін (PEI), модифікований з PEG (PEI-PEG), поліглутамінова кислота (PGA) (співполімери N-(2-гідроксипропіл) метакриламід (HPMA)), гіалуронова кислота, радіоактивні речовини (наприклад, ^{90}Y , ^{131}I), флуоресцентні речовини, люмінесцентні речовини, гаптени, ферменти, хелати металів, лікарські засоби і токсини (наприклад, кальхеаміцин, екзотоксин A *Pseudomonas*, рицин (наприклад, A-ланцюг деглікозильованого рицину)).

В одному варіанті здійснення для покращення цитотоксичної дії антитіл до PD-1 і, як наслідок, їх терапевтичної ефективності, антитіла кон'югують з високотоксичними речовинами,

включаючи радіоізотопи і цитотоксичні агенти. Ці кон'югати можуть вибірково доставляти токсичне навантаження в цільовий сайт (тобто клітини, які експресують антиген, який розпізнається антитілом), в той час як клітини, які не розпізнаються антитілом, зберігаються. Щоб звести до мінімуму токсичність, кон'югати зазвичай конструюють на основі молекул із

5 коротким часом напівжиття в сироватці (таким чином, використовуються мишачі послідовності й ізотипи IgG3 або IgG4).

У певних варіантах здійснення антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент модифікують фрагментом, який покращує його стабілізацію та/або утримання в системі кровообігу, наприклад, в крові, сироватці або інших тканинах, наприклад, у щонайменше 1,5, 2, 10 або 50 разів. Наприклад, антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент може бути зв'язаний (наприклад, кон'югований з) полімером, наприклад, по суті неантигенним полімером, як-от поліалкіленоксид або поліетиленоксид. Придатні полімери будуть істотно відрізнятися за масою. Можна використовувати полімери, які мають середньочислову молекулярну масу в діапазоні від близько 200 до близько 35000 Дальтон (або від близько 1000 до близько 15000, і від 2000 до близько 12500). Наприклад, антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент можна кон'югувати з водорозчинним полімером, наприклад, з гідрофільним полівініловим полімером, наприклад, із полівініловим спиртом або полівінілпіролідом. Приклади таких полімерів включають гомополімери поліалкіленоксиду, як-от поліетиленгліколь (PEG) або поліпропіленгліколи, поліоксиетиленовані поліолі, їх співполімери та їх блок-співполімери, за умови, що розчинність блок-співполімерів у воді зберігається. Додаткові корисні полімери включають поліоксиалкілени, як-от поліоксиетилен, поліоксипропілен, і блок-співполімери поліоксиетилену і поліоксипропілену; поліметакрилати; карбомери; і розгалужені або нерозгалужені полісахариди.

Вищеописані кон'юговані антитіла можуть бути отримані шляхом проведення хімічних модифікацій антитіл або їх форм із більш низькою молекулярною масою, описаних у цьому документі. Способи модифікації антитіл добре відомі в цій області техніки (наприклад, US 5057313 і US 5156840).

Способи отримання антитіл

Антитіла можуть бути отримані в бактеріальних або еукаріотичних клітинах. Деякі антитіла, наприклад, Fab, можуть бути отримані в бактеріальних клітинах, наприклад, клітинах *E. coli*. Антитіла також можуть бути отримані в еукаріотичних клітинах, як-от трансформовані клітинні лінії (наприклад, CHO, 293E, COS). Крім того, антитіла (наприклад, scFv) можуть бути експресовані в дріжджовій клітині, як-от *Pichia* (див., наприклад, Powers et al., *J Immunol Methods*. 251:123-35 (2001)), *Hansenula*, або *Saccharomyces*. Щоб отримати антитіло, яке становить інтерес, конструюють полінуклеотид, що кодує антитіло, вводять його в вектор експресії й потім експресують його в придатних клітинах-господарях. Для приготування рекомбінантного вектора експресії, трансфекції клітин-господарів, відбору трансформантів, культивування клітин-господарів і виділення антитіла використовуються стандартні методи молекулярної біології.

Якщо антитіло має бути експресоване в бактеріальних клітинах (наприклад, *E. coli*), вектор експресії має мати характеристики, які дозволяють ампліфікувати вектор в бактеріальних клітинах. Додатково, коли таку *E. coli*, як JM109, DH5 α , HB101 або XL1-Blue, застосовують в якості господаря, вектор повинен мати промотор, наприклад, промотор lacZ (Ward et al., 341:544-546 (1989), промотор araB (Better et al., *Science*, 240:1041-1043(1988)) або промотор T7, який може забезпечити ефективну експресію в *E. coli*. Приклади подібних векторів включають, наприклад, вектори серій M13, вектори серій pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "систему QIAexpress" (QIAGEN), pEGFP і pET (коли застосовують цей вектор експресії, господар переважно являє собою BL21, який експресує РНК-полімеразу T7). Для експресії антитіл вектор експресії може містити сигнальну послідовність. Для продукування *E. coli* в периплазмі, в якості сигнальної для секреції антитіл послідовності може бути застосована сигнальна послідовність pelB (Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169:4379 (1987)). Для бактеріальної експресії можуть бути використані методи з використанням хлориду кальцію або методи електропорації для введення вектора експресії в бактеріальну клітину.

Якщо антитіло має експресуватися в клітинах тварин, як-от клітини CHO, COS і NIH3T3, вектор експресії містить промотор, необхідний для експресії в цих клітинах, наприклад, промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature*, 277:108(1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322(1990)) або промотор CMV. На додаток до послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує імуноглобулін або його домен, рекомбінантні вектори експресії можуть нести додаткові послідовності, як-от послідовності, які регулюють реплікацію вектора в клітинах-господарях (наприклад, точки початку реплікації), і селектовані

маркерні гени. Селектований маркерний ген полегшує відбір клітин-господарів, в які був введений вектор (див., наприклад, патенти США №№ 4399216, 4634665 та 5179017). Наприклад, селектований маркерний ген зазвичай надає стійкості відносно лікарських засобів, як-от G418, гідроміцин або метотрексат, клітини-господаря, в яку був введений вектор.

5 Приклади векторів із селектованими маркерами включають pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV і pOP13.

В одному варіанті здійснення антитіла виробляються в клітинах ссавців. Ілюстративні клітини-господарі ссавців для експресування антитіла включають клітини яєчника китайського хом'яка (клітини CHO) (в тому числі клітини dhfr-CHO, описані в Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, використовувані з селектованому маркером DHFR, наприклад, як описано в Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621) клітини нирки ембріона людини 293 (наприклад, 293, 293E, 293T), клітини COS, клітини NIH3T3, лімфоцитарні клітинні лінії, наприклад, клітини мієломи NS0 і клітини SP2, і клітину від трансгенної тварини, наприклад, трансгенного ссавця. Наприклад, клітина являє собою епітеліальну клітину молочної залози.

10 15

В ілюстративній системі для експресії антитіл, рекомбінантний вектор експресії, який кодує обидва, важкий і легкий, ланцюги антитіла до PD-1 (наприклад, антитіла X), вводять в клітини dhfr-CHO за допомогою опосередкованої фосфатом кальцію трансфекції. У межах рекомбінантного вектора експресії кожен із генів важкого і легкого ланцюга антитіла функціонально зв'язаний з регуляторними елементами енхансера/промотора (наприклад, отриманими з SV40, CMV, аденовірусу й подібного, як-от регуляторний елемент енхансера CMV/промотора AdMLP або регуляторний елемент енхансера SV40/промотора AdMLP) для управління високими рівнями транскрипції генів. Рекомбінантний вектор експресії також несе ген DHFR, який робить можливим селекцію клітин CHO, які були трансфіковані вектором із використанням селекції/ампліфікації за допомогою метотрексату. Відібрані трансформовані клітини-господарі культивують, щоб уможливити експресію важкого і легкого ланцюгів антитіла, і виділяють антитіло з культурального середовища.

20 25

Антитіла також можуть вироблятися трансгенним тваринам. Наприклад, в патенті США № US 5849992 описаний спосіб експресування антитіла в молочній залозі трансгенного ссавця. Конструюють трансген, який містить специфічний відносно молока промотор і нуклеїнові кислоти, які кодують антитіло, що становить інтерес, і сигнальну послідовність для секреції. Молоко, що виробляється самицями таких трансгенних ссавців, містить в собі секретоване антитіло, яке становить інтерес. Антитіло може бути очищено від молока або використано безпосередньо для деяких застосувань. Також пропонуються тварини, що містять одну або більше нуклеїнових кислот, описаних у цьому документі.

30 35

Антитіла за цим розкриттям можуть виділятися всередину або назовні (наприклад, у середовищі) клітини-господаря і очищені до по суті чистих і гомогенних антитіл. Для виділення і очищення антитіл можуть бути використані методи виділення і очищення, зазвичай застосовуються для очищення антитіл, і не обмежені будь-яким конкретним способом. Антитіла можуть бути виділені і очищені за допомогою відповідного вибору і комбінування, наприклад, колонкової хроматографії, фільтрації, ультрафільтрації, висолювання, осадження розчинниками, екстракції розчинниками, дистиляції, імунопреципітації, електрофорезу в SDS-поліакриламідному гелі, ізоелектричного фокусування, діалізу і перекристалізації. Хроматографія включає, наприклад, афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрацію, обернено-фазну хроматографію і адсорбційну хроматографію (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматографія може бути проведена з використанням рідкофазної хроматографії, як-от ВЕРХ і FPLC. Колонки, які застосовуються для афінної хроматографії, включають колонку з білком А і колонку з білком G. Приклади колонок із використанням колонки з білком А включають Hyper D, POROS і Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Цей опис також включає антитіла, які є високоочищеними з використанням зазначених способів очищення.

40 45 50

Антитіла до PD-1 зі зміненим глікозилуванням

Різні глікоформи можуть істотно впливати на властивості терапевтичного засобу, включаючи фармакокінетику, фармакодинаміку, взаємодію рецепторів і тканинспецифічне націлювання (Graddis et al., 2002 Curr Pharm Biotechnol. 3: 285–297). Зокрема, для антитіл структура олігосахариду може впливати на властивості, які стосуються стійкості до протеаз, часу напівжиття антитіла в сироватці, опосередкованого рецептором FcRn, фагоцитозу і зворотного зв'язку антитіла, на додаток до ефекторних функцій антитіла (наприклад, зв'язування з комплексом C1 комплементу, який індукує K3LC, і зв'язування з рецепторами FcγR, які

55 60

відповідають за модуляцію шляху A3KЦ) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, PNAS, 89: 4285–4289).

Відповідно, інший спосіб модуляції ефекторних функцій антитіл включає зміну глікозилювання константної ділянки антитіла. Змінене глікозилювання включає, наприклад, зменшення або збільшення кількості глікозилюваних залишків, зміну структури або розташування глікозилюваних залишків, а також зміну структури (структур) цукру. Олігосахариди, виявлені в IgG людини, впливають на ступінь їх ефекторних функцій (Raju, TS BioProcess International April 2003. 44-53); мікрогетерогенність олігосахаридів IgG людини може впливати на біологічні функції, як-от K3Ц і A3KЦ, зв'язування з різними Fc-рецепторами і зв'язування з білком Clq (Wright A. & Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604; Shields et al. J Biol Chem. 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et al. J Biol Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176–80). Наприклад, здатність IgG зв'язувати C1q і активувати каскад комплементу може залежати від присутності, відсутності або модифікації вуглеводного фрагмента, розташованого між двома доменами CH2 (який зазвичай закріплений на Asn297) (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)).

Сайти глікозилювання в Fc-вмісному поліпептиді, наприклад, в антитілі, як-от антитіло IgG, можна ідентифікувати за допомогою стандартних методик. Ідентифікація сайту глікозилювання може бути експериментальною або заснована на аналізі послідовності або даних моделювання. Були описані консенсусні мотиви, тобто амінокислотна послідовність, яка розпізнається різними глікозилтрансферазами. Наприклад, консенсусним мотивом для мотиву N-зв'язаного глікозилювання часто є NXT або NXS, де X може являти собою будь-яку амінокислоту, крім проліну. Також описано кілька алгоритмів локалізації потенційного мотиву глікозилювання. Відповідно, щоб ідентифікувати потенційні сайти глікозилювання в межах антитіла або Fc-вмісного фрагмента, послідовність антитіла досліджується, наприклад, з використанням загальнодоступних баз даних, наприклад веб-сайту, наданого Центром аналізу біологічних послідовностей (див. сервіси NetNGlyc для прогнозування сайтів N-зв'язаного глікозилювання і сервіси NetOGlyc для прогнозування сайтів O-зв'язаного глікозилювання).

In vivo дослідження підтвердили зниження ефекторних функцій аглікозильних антитіл. Наприклад, аглікозильні антитіла до CD8 не здатні виснажувати CD8-несучі клітини у мишей (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062) і аглікозильні антитіла до CD3 не викликають синдром вивільнення цитокінів у мишей або людей (Boyd, 1995 вище; Friend, 1999. Transplantation 68:1632). Аглікозильовані форми антитіла до PD-1 також мають знижену ефекторну функцію.

Важливо відзначити, що хоча видалення гліканів у домені CH2, мабуть, значно впливає на ефекторну функцію, інші функціональні та фізичні властивості антитіла залишаються незмінними. Зокрема, було показано, що видалення гліканів практично не впливає на час напівжиття в сироватці і зв'язування з антигеном (Nose, 1983 вище; Tao, 1989 вище; Dorai, 1991 вище; Hand, 1992 вище; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949).

Антитіла до PD-1 згідно з цим винаходом можна модифікувати або змінювати, щоб викликати посилення або зниження ефекторних функцій (-й) (у порівнянні з другим антитілом, специфічним до PD-1). Способи зміни сайтів глікозилювання антитіл описані, наприклад, в US 6350861 і US 5714350, WO 05/18572 та WO 05/03175; ці способи можна використовувати для отримання антитіл до PD-1 згідно з цим винаходом зі зміненим, зменшеним глікозилюванням або без нього.

Показання

Антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент, описані в цьому документі, можна використовувати для лікування або профілактики різних захворювань, включно зі злоякісним новоутворенням. Злоякісні новоутворення, які можна лікувати або запобігати за допомогою введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагменту, включають наступне: рак надниркових залоз, рак анального каналу, СНІД-асоційований рак, альвеолярна саркома м'яких тканин, рак сечового міхура, рак кісток, рак головного і спинного мозку, рак молочної залози, пухлина каротидного тільця, рак шийки матки, хондросаркома, хордома, хромофобна нирково-клітинна карцинома, світлоклітинна карцинома, рак товстої кишки, колоректальний рак, доброякісна фіброзна гістіоцитома шкіри, десмопластична дрібнокруглоклітинна пухлина, епендиміома, рак ендометрію, пухлина Юінга, позаклітинна міксоїдна хондросаркома, недосконалий фіброгенез, фіброзна дисплазія кісток, рак жовчного міхура або жовчних проток, рак шлунково-кишкового тракту, гестаційна трофобластична хвороба, герміногенна пухлина, рак голови і шиї, гепатоцелюлярна карцинома, інсулома, саркома Капоші, рак нирки, лейкоз, ліпома/доброякісна ліпоматозна пухлина, ліпосаркома/злоякісна ліпоматозна пухлина, рак печінки, лімфома, рак легені, медулобластома,

меланома, менінгіома, карцинома з клітин Меркеля, множинні ендокринні неоплазії, множинна міелома, мієлодиспластичний синдром, нейробластома, нейроендокринні пухлини, рак яєчників, рак підшлункової залози, папілярна карцинома щитовидної залози, пухлина навколощитовидної залози, рак у дитячому віці, пухлина оболонки периферичних нервів, феохромоцитома, пухлина гіпофізу, рак передміхурової залози, задня увеальна меланома, рідкісне гематологічне захворювання, метастатичний рак нирки, рабдоїдна пухлина, рабдомісаркома, саркома, рак шкіри, саркома м'яких тканин, плоскоклітинний рак, рак шлунка, синовіальна саркома, рак яєчок, карцинома тимуса, тимома, метастатичний рак щитовидної залози і рак матки.

Зокрема, антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент, описані в цьому документі, можна використовувати при лікуванні раку анального каналу, раку сечового міхура, раку молочної залози, колоректального раку, раку ендометрію, гепатоцелюлярної карциноми, гліоми, раку нирки, раку легені, карциноми з клітин Меркеля, множинної міеломи, нейробластоми, неходжкінської лімфоми, недрібноклітинного раку легені, раку яєчників, раку підшлункової залози, раку прямої кишки і саркоми.

Зокрема, антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент, описані в цьому документі, можна використовувати при лікуванні раку ендометрію (включаючи недиференційований рак ендометрію, рак ендометрію з високою MSI, рак ендометрію з dMMR та/або позитивний за мутацією в екзонуклеазному домені POLE рак ендометрію), саркому м'яких тканин, недрібноклітинний рак легені (НДРЛ) або рак шийки матки.

Площоклітинна карцинома анального каналу

Площоклітинна карцинома анального каналу (SCAC) становить майже 3 % випадків злویкісних новоутворень травної системи, та її частота збільшується через зв'язок із ВПЛ і ВІЛ-інфекцією. Хоча більшість пацієнтів мають локалізоване захворювання, системні метастази будуть розвиватися у близько 25 % пацієнтів, а 5-річна виживаність у цих індивідуумів низька. Резервна хіміотерапія з використанням схем на основі платини є загальноприйнятим стандартом лікування; однак відповідь на лікування нетривала, а загальна виживаність без прогресування після цих способів лікування вимірюється тільки місяцями. Не існує загальноприйнятих резервних способів лікування пацієнтів, у яких спостерігається прогресування після хіміотерапії першої лінії.

Карцинома з клітин Меркеля

Карцинома з клітин Меркеля являє собою рідкісне, агресивне шкірне злویкісне новоутворення, пов'язане з безліччю факторів, як-от поліомавірус клітин Меркеля, УФ-опромінення і імуносупресія. Це захворювання, як правило, виявляють у людей похилого віку зі світлим типом шкіри і воно має поганий прогноз із більш низькими показниками виживаності в порівнянні з іншими злویкісними новоутвореннями шкіри. Хірургічне втручання та/або радіотерапія показані та потенційно виликовують місцево-регіонарне захворювання, а рецидиви є звичайним явищем.

5-річна виживаність пацієнтів із ККМ становить 75 %, 59 % і 25 % для первинних локалізованих пухлин, пухлин із метастазами в регіонарні лімфатичні вузли (або локальних рецидивів) і пухлин із віддаленими метастазами, відповідно. Більше ніж у 30 % пацієнтів розвинеться захворювання з віддаленими метастазами, а 5-річна виживаність для цих пацієнтів становить всього близько 10 %.

Історично метастатичний ККМ лікували із застосуванням схем хіміотерапії, аналогічних тим, які використовуються при дрібноклітинному раку легені. Хіміотерапія на основі платини забезпечує високу частоту початкової відповіді та має коротку тривалість. Хіміотерапія при цьому захворюванні ніколи не продемонструвала переваги в виживанні. Хіміотерапія також пов'язана з ризиком важкої токсичності та смерті від інтоксикації, особливо серед літніх пацієнтів.

Рак ендометрію

Рак ендометрію є четвертим за поширеністю злویкісним новоутворенням, яке вражає американських жінок: за оцінками, було діагностовано 60050 нових випадків; за оцінками станеться 10470 смертей, пов'язаних із раком ендометрію, що зробить його шостим за частотою смертей, пов'язаних зі злویкісним новоутворенням, серед американських жінок. У всьому світі це четверта за частотою причина смерті жінок від злویкісних новоутворень. Рак ендометрію є найбільш частим гінекологічним злویкісним новоутворенням у жінок, причому аденокарцинома є найбільш частим гістологічним захворюванням. Злویкісні новоутворення, діагностовані на ранній стадії, мають хороший прогноз із варіантами лікування у вигляді хірургічного втручання та/або радіотерапії, але агресивне злویкісне новоутворення на пізній стадії має обмежене число варіантів лікування, з п'ятирічною виживаністю в діапазоні від 20 до 60 %. Стандартні методи лікування місцевопоширеного або метастатичного злویкісного новоутворення

включають системні способи лікування, як-от гормональна терапія, хіміотерапія з використанням одного агента, наприклад, доксорубіцину, або комбіновані схеми хіміотерапії на основі платини, як-от карбоплатин і доцетаксел. З огляду на несприятливий довгостроковий прогноз для цих пацієнтів, необхідні додаткові й нові способи лікування.

5 Фармацевтичні композиції

Антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент, описані в цьому документі, можуть бути складені у вигляді фармацевтичної композиції для введення суб'єкту, наприклад, для лікування розладу, описаного в цьому документі. Зазвичай фармацевтична композиція містить фармацевтично прийнятний носій. У контексті цього документу термін "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які та всі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні й протигрибкові агенти, ізотонічні та агенти, що уповільнюють всмоктування, тощо, які є фізіологічно сумісними. Композиція може містити фармацевтично прийнятну сіль, наприклад, кислоту приєднання основи або сіль приєднання основи (див., наприклад, Berge, SM, et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

15 Фармацевтична композиція належить до добре відомої області техніки, яка додатково описана, наприклад, у Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); і Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

20 Фармацевтичні композиції можуть бути в різних формах. До них належать, наприклад, рідкі, напівтверді та тверді дозовані форми, як-от рідкі розчини (наприклад, розчини для ін'єкцій та інфузій), дисперсії або суспензії, таблетки, пігулки, порошки, ліпосоми і супозиторії. Переважна форма може залежати від ймовірного способу введення і терапевтичного застосування. Зазвичай композиції для агентів, описаних у цьому документі, перебувають у формі розчинів для ін'єкцій або інфузій.

Композиція може бути складена у вигляді розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, що підходить для стабільного зберігання при високій концентрації. Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути отримані шляхом включення агента, описаного в цьому документі, в необхідній кількості у відповідний розчинник з одним або комбінацією інгредієнтів, перерахованих вище, залежно від необхідності, з подальшою стерилізацією фільтруванням. Зазвичай дисперсії готують шляхом включення агента, описаного в цьому документі, в стерильний носій, який містить основне дисперсійне середовище та інші необхідні інгредієнти з перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних розчинів для ін'єкцій переважними способами приготування є вакуумне сушіння та сублімаційне сушіння, які призводять до утворення порошку агента, описаного в цьому документі, плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з його попередньо стерилізованого фільтруванням розчину. Належна плинність розчину може підтримуватись, наприклад, шляхом застосування покриття, як-от лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсії й шляхом застосування поверхнево-активних речовин. Подовжене всмоктування ін'єкційних композицій можна забезпечити шляхом включення в композицію агента, який уповільнює всмоктування, наприклад, моностеаратних солей або желатину.

У певних варіантах здійснення антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент можна приготувати з носієм, який буде захищати сполуку від швидкого вивільнення, як-от композиція з контрольованим вивільненням, включаючи імплантати, і мікроінкапсульовані системи доставки. Можна використовувати біосумісні полімери або полімери, що біорозкладаються, як-от етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоестери і полімолочна кислота. Багато зі способів приготування таких композицій запатентовані або загальновідомі. Див., наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Введення

Антитіло до PD-1 або його антигензв'язувальний фрагмент можна вводити суб'єкту, наприклад, суб'єкту, який цього потребує, наприклад, людині, різними способами. Для багатьох застосувань шлях введення є одним із таких: внутрішньовенна ін'єкція або інфузія (в/в), підшкірна ін'єкція (п/ш), внутрішньоочеревинна (в/о) або внутрішньом'язова ін'єкція. Також можливе застосування внутрішньосуглобової доставки. Також можна використовувати інші способи парентерального введення. Приклади таких способів включають: внутрішньоартеріальну, інтратекальну, інтракапсулярну, інтраорбітальну, внутрішньосерцеву, інтракапсулярну, транстрахеальну, підшкірну, внутрішньосуглобову, інтракапсулярну, субарахноїдальну, субкапсулярну, епідуральну та інтрастернальну ін'єкцію. У деяких випадках

введення може бути пероральним.

Шлях та/або спосіб введення антитіла або його антигензв'язувального фрагмента також можуть бути адаптовані для конкретного випадку, наприклад, шляхом спостереження за суб'єктом, наприклад, з використанням томографічної візуалізації, наприклад, для візуалізації пухлини.

Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент можна вводити у вигляді фіксованої дози або в дозі мг/кг маси пацієнта. Доза також може бути обрана так, щоб зменшити або уникнути продукції антитіл проти антитіла до PD-1. Схеми застосування коригують для забезпечення бажаної відповіді, наприклад, терапевтичної відповіді або комбінаторного терапевтичного ефекту. Зазвичай дози антитіла до PD-1 (і, необов'язково, другого агента) можна використовувати для забезпечення суб'єкта агентом у біодоступних кількостях. Наприклад, дози в діапазоні близько 0,1–100 мг/кг, близько 0,5–100 мг/кг, близько 1 мг/кг–100 мг/кг, близько 0,5–20 мг/кг, близько 0,1–10 мг/кг або можна вводити близько 1–10 мг/кг. Також можна використовувати інші дози. У конкретних варіантах здійснення суб'єкту, який потребує лікування антитілом до PD-1, вводять антитіло в дозі близько 1 мг/кг, близько 2 мг/кг, близько 3 мг/кг, близько 4 мг/кг, близько 5 мг/кг, близько 10 мг/кг, близько 15 мг/кг, близько 20 мг/кг, близько 30 мг/кг, близько 35 мг/кг або близько 40 мг/кг. Відносно доз або дозувань, термін "близько" призначений для позначення діапазону, який становить $\pm 10\%$ від заявленої дози, так що, наприклад, доза близько 3 мг/кг становитиме від 2,7 мг/кг до 3,3 мг/кг маси пацієнта.

Композиція може містити від близько 1 мг/мл до 100 мг/мл або від близько 10 мг/мл до 100 мг/мл, або від близько 50 до 250 мг/мл, або від близько 100 до 150 мг/мл, або від близько 100 до 250 мг/мл антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента.

У контексті цього документа одинична дозована форма, або "фіксована доза", або "постійна доза" стосується фізично дискретних одиниць, придатних в якості одиничних доз для суб'єктів, які підлягають лікуванню; кожна одиниця містить задану кількість активної сполуки, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту в поєднанні з необхідним фармацевтичним носієм і, необов'язково, в поєднанні з іншим агентом. Можуть бути запропоновані одне або багато дозувань. Альтернативно або додатково антитіло можна вводити шляхом безперервної інфузії. Ілюстративні фіксовані дози включають близько 375 мг, близько 500 мг і близько 750 мг. У деяких варіантах здійснення відносно доз або дозувань термін "близько" призначений для позначення діапазону, який становить $\pm 10\%$ від заявленої дози, так що, наприклад, доза близько 375 мг становитиме від 337,5 мг до 412,5 мг.

Дозу антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента можна вводити, наприклад, з періодичним інтервалом протягом періоду часу (курсу лікування), достатнього, щоб охопити щонайменше 2 дози, 3 дози, 5 доз, 10 доз або більше, наприклад, один або два рази на день, або від близько одного до чотирьох разів на тиждень, або переважно щотижня, раз на два тижні (кожні два тижні), раз на три тижні, щомісяця, наприклад, протягом від близько 1 до 12 тижнів, переважно від 2 до 8 тижнів, більш переважно від близько 3 до 7 тижнів і навіть більш переважно від близько 4, 5 або 6 тижнів. Фактори, які можуть впливати на дозування і терміни, необхідні для ефективного лікування суб'єкта, включають, наприклад, ступінь тяжкості захворювання або розладу, композицію, спосіб доставки, попереднє лікування, загальний стан здоров'я та/або вік суб'єкта, а також інші наявні захворювання. Більше того, лікування суб'єкта терапевтично ефективною кількістю сполуки може включати одноразове лікування або, переважно, може включати серію курсів лікування.

Ілюстративний режим дозування включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента у фіксованій дозі близько 375 мг один раз на 3 тижні. Інший ілюстративний режим дозування включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента в фіксованій дозі близько 500 мг один раз на 4 тижні. Ще один ілюстративний режим дозування включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента у фіксованій дозі близько 750 мг один раз на 4 тижні.

Ілюстративний режим дозування на основі маси включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента в дозі близько 1 мг/кг один раз на 2 тижні. Інший ілюстративний режим дозування на основі маси включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента в дозі близько 3 мг/кг один раз на 2 тижні. Інший ілюстративний режим дозування на основі маси включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента в дозі близько 3 мг/кг один раз на 4 тижні. Інший ілюстративний режим дозування на основі маси включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента в дозі близько 10 мг/кг один раз кожні 2 тижні. Інший ілюстративний режим дозування на основі маси включає введення антитіла до PD-1 або його антигензв'язувального фрагмента в дозі близько 10 мг/кг один раз кожні 4 тижні.

Фармацевтична композиція може містити "терапевтично ефективну кількість" агента, описаного в цьому документі. Такі ефективні кількості можна визначити на підставі ефекту введення агента або комбінаторного ефекту агентів, якщо використовується більше одного агента. Терапевтично ефективна кількість агента також може варіюватися залежно від таких факторів, як хворобливий стан, вік, стать і маса індивідуума, а також здатність сполуки викликати бажану відповідь у індивідуума, наприклад, поліпшення щонайменше одного параметра розладу або поліпшення щонайменше одного симптому розладу. Терапевтично ефективна кількість також є такою, в якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти композиції переважаються терапевтично сприятливими ефектами.

Далі представлені приклади здійснення на практиці цього винаходу. Вони жодним чином не мають тлумачитися як такі, що обмежують обсяг цього винаходу.

ПРИКЛАДИ

Нижченаведені приклади представлені для кращої ілюстрації заявленого винаходу і не мають інтерпретуватися як такі, що обмежують обсяг винаходу. У тому обсязі, в якому згадуються конкретні матеріали, вони наведені тільки з метою ілюстрації і не призначені для обмеження винаходу. Фахівець у цій галузі техніки може розробити еквівалентні засоби або реагенти, не проявляючи винахідницьких здібностей і не виходячи за межі обсягу винаходу.

Приклад 1. Дослідження фази 2 антитіла X у учасників із плоскоклітинною карциномою анального каналу (SCAC), у яких виявили прогресування після хіміотерапії на основі платини

Це відкрите, одноступеневе, багатоступеневе дослідження фази 2 для учасників із місцевопоширеним або метастатичним SCAC, у яких виявили прогресування при стандартному режимі хіміотерапії на основі платини. Учасники з добре контрольованою ВІЛ-інфекцією задовольняють критеріям включення. Усі учасники отримують антитіло X в рекомендованій для фази 2 дозі 500 мг в/в один раз на чотири тижні (Q4W). Первинною кінцевою точкою є ЧОВ, як визначено незалежною централізованою оцінкою з використанням RECIST v1.1.

Дослідження складається з 3 періодів: скринінг, лікування досліджуваними лікарськими засобами та подальше спостереження. Лікування може тривати до 2 років за відсутності клінічного прогресування захворювання, неприйнятної токсичності, смерті, відкликання інформованої згоди, неможливості подальшого спостереження внаслідок втрати контакту або передчасного припинення лікування з якоїсь іншої причини.

Учасники, які досягли повної відповіді, можуть припинити прийом антитіла X після 2 додаткових циклів після консультації з медичним монітором.

Лікування проводять шляхом внутрішньовенної інфузії протягом 60 хвилин у 1-й день кожного 28-денного циклу. Подальші цикли лікування слід відкласти (до 12 тижнів) доти, поки не будуть виконані такі критерії:

- Гемоглобін ≥ 8 г/дл.
- АКН $\geq 1,0 \times 10^9$ /л.
- Кількість тромбоцитів $\geq 75 \times 10^9$ /л.
- АЛТ/АСТ/білірубін ≤ 2 ступеню.

- Усунення всієї токсичності, що діє на імунну систему, до ≤ 1 ступеню (за винятком ендокринопатії, яка контролюється гормональною замісною терапією), за винятком неприйнятної токсичності.

- Усунення всієї токсичності, що діє на неімунну систему, до ≤ 1 ступеню або вихідного рівня (за винятком алопеції або незалежної від трансфузії анемії). Тимчасове безсимптомне підвищення лабораторних показників ≤ 3 ступеню не вимагає переривання або зниження дози, якщо в учасника немає симптомів, а підвищення є клінічно несуттєвим і обговорюється з медичним монітором (наприклад, амілаза, ліпаза).

- Добова доза кортикостероїдів ≤ 10 мг преднізону або його еквівалента.

Період подальшого спостереження починається після того, як учасник завершив 2 роки застосування досліджуваного лікарського засобу або передчасно припинив застосування досліджуваного лікарського засобу. Учасники оцінюються на предмет небажаних явищ протягом 90 днів після прийому останньої дози досліджуваного лікарського засобу або до початку іншої протипухлинної терапії, залежно від того, що станеться раніше.

Після того, як учасники припиняють лікування, вони включаються в період подальшого спостереження й оцінюються на виживаність до завершення дослідження. Учасники, які припиняють лікування в рамках дослідження без прогресування захворювання, будуть включені в період подальшого спостереження і продовжать проходити оцінку пухлини відповідно до графіка проведення заходів доти, поки не виявиться прогресування захворювання, не почнуть нове протипухлинне лікування, не відклинуть інформовану згоду, подальше спостереження буде неможливим внаслідок втрати контакту або до тих пір, поки не буде зафіксований випадок

смерті.

Для НЯ дозволені модифікації дози антитіла Х. Перед початком кожного циклу лікування учасник повинен відповідати критеріям продовження лікування перед введенням антитіла Х. Якщо критерії не дотримані на початку циклу лікування, інфузія антитіла Х може бути відкладена до 12 тижнів для усунення будь-яких аномальних лабораторних результатів або НЯ. Учасників слід виключити з активної частини дослідження, якщо критерії повторного лікування не будуть виконані протягом 12 тижнів після запланованого початку циклу. Після усунення невідповідності критеріям учасники можуть відновити лікування, якщо немає патологічного стану або інших обставин, які на думку дослідника зробили б учасника непридатним для подальшої участі в дослідженні. Якщо застосування антитіла Х необхідно припинити через неприйнятну токсичність, учасник має бути відсторонений від активного лікування і переведений на період подальшого спостереження в дослідженні.

Приклад 2. Фаза 2 дослідження антитіла Х у пацієнтів з метастатичною карциномою з клітин Меркеля (ККМ)

Це відкрите, непорівняльне, багатоцентрове дослідження фази 2, призначене для оцінки клінічної активності та безпеки антитіла Х у учасників із метастатичною ККМ. У це дослідження будуть включені учасники з метастатичною ККМ, в тому числі ті, хто раніше не проходив хіміотерапію, а також ті, хто раніше отримував хіміотерапію і які в іншому відповідають усім критеріям включення. Усі учасники повинні надати зразки тканин (свіжі або архівні) на централізовану оцінку патології. Учасники, у яких ККМ не підтверджена даними патологічного дослідження, можуть залишитися на досліджуваному лікуванні, але будуть замінені іншими для аналізу ефективності.

Усі учасники, які відповідають критеріям відбору під час скринінгу, отримають лікування антитілом Х. Первинною кінцевою точкою є ЧОВ, як визначено ICR (незалежною централізованою перевіркою) відповідно до RECIST v1.1.

Досліджуване лікування буде складатися з монотерапії антитілом Х, яка вводиться в рекомендованій для Фази 2 дозі 500 мг шляхом внутрішньовенної інфузії один раз на 28 днів. Лікування досліджуваним лікарським засобом може тривати до 2 років за відсутності клінічного прогресування захворювання, неприйнятної токсичності, смерті, відкликання інформованої згоди, неможливості подальшого спостереження внаслідок втрати контакту або передчасного припинення лікування з якоїсь іншої причини.

Дослідження складається з 3 періодів: скринінг, лікування досліджуваними лікарськими засобами та подальше спостереження.

Учасники, які відповідають критеріям, отримають лікування монотерапією антитілом Х в дозі 500 мг, що вводиться в/в протягом 60 хвилин в 1-й день кожного 28-денного циклу. Критерії до початку лікування, які мають дотримуватися в кожному циклі, включають таке:

- Гемоглобін ≥ 8 г/дл
- АКН $\geq 1,0 \times 10^9$ /л
- Кількість тромбоцитів $\geq 75 \times 10^9$ /л
- АЛТ/АСТ/білірубін ≤ 2 ступеню

- Усунення всієї токсичності, що діє на імунну систему, до ≤ 1 ступеню (за винятком ендокринопатії, яка контролюється гормональною замісною терапією).

- Усунення всієї токсичності, що діє на неімунну систему, до ≤ 1 ступеню або вихідного рівня (за винятком алопеції або незалежної від трансфузії анемії). Тимчасове безсимптомне підвищення лабораторних показників ≤ 3 ступеню не вимагає переривання або зниження дози, якщо в учасника немає симптомів, та якщо підвищення є клінічно несуттєвим і обговорюється з медичним монітором.

Період подальшого спостереження починається після того, як учасник завершив або передчасно припинив застосування досліджуваного лікарського засобу. Учасників оцінюють на предмет НЯ та інших параметрів безпеки протягом 90 днів після прийому останньої дози досліджуваного лікарського засобу.

Після того як учасники припиняють лікування, вони включаються в період подальшого спостереження і будуть оцінюватися на виживаність до завершення дослідження. Учасники, які припиняють лікування в рамках дослідження без прогресування захворювання, будуть включені в період подальшого спостереження і продовжать проходити оцінку пухлини відповідно до графіка проведення заходів доти, поки не виявиться прогресування захворювання, не почнуть нове протипухлинне лікування, не відклинуть інформовану згоду, подальше спостереження буде неможливим внаслідок втрати контакту або до тих пір, поки не буде зафіксований випадок смерті.

Для НЯ дозволені модифікації дози антитіла Х. Перед початком кожного циклу лікування

учасник повинен відповідати критеріям продовження лікування перед введенням антитіла Х. Якщо критерії не дотримані на початку циклу лікування, інфузія антитіла Х може бути відкладена до 12 тижнів для усунення будь-яких аномальних лабораторних результатів або НЯ. Учасників слід виключити з активної частини дослідження, якщо критерії повторного лікування не будуть виконані протягом 12 тижнів після запланованого початку циклу. Після усунення невідповідності критеріям учасники можуть відновити лікування, якщо немає патологічного стану або інших обставин, які на думку дослідника зробили б учасника непридатним для подальшої участі в дослідженні. Якщо застосування антитіла Х необхідно припинити через неприйнятну токсичність, учасник має бути відсторонений від активного лікування і переведений на період подальшого спостереження в дослідженні.

Приклад 3. Дослідження фази 1 за оцінкою безпеки, переносимості та фармакокінетики антитіла Х у пацієнтів із раком ендометрію

Це дослідження являє собою відкрите дослідження фази 1, дослідження з підвищенням дози і розширенням когорти, розроблене для визначення характеристик безпеки, переносимості, ФК, ФД, імуногенності та попередньої протипухлинної активності антитіла Х, яке вводиться в/в кожні два або чотири тижні, у пацієнтів із рецидивуючими/рефрактерними, неоперабельними місцево поширеними або метастатичними солідними пухлинами.

Дослідження складається з двох фаз: фази підвищення дози і фази розширення когорти.

Усім пацієнтам, включеним у дослідження, антитіло Х вводять шляхом внутрішньовенної інфузії протягом 60 хвилин. Для цілей визначення інтервалу лікування протягом цього дослідження один цикл визначається як 28 днів або чотири (4) тижні. Дві схеми введення антитіла Х будуть вивчені на фазах підвищення дози і розширення когорти: один раз на два тижні (Q2W) або один раз на чотири тижні (Q4W); крім того, схема введення постійних/фіксованих доз антитіла Х (Q4W) буде вивчатися лише під час фази розширення. Як для фази підвищення дози, так і для фази розширення когорти оцінки пухлини у пацієнтів будуть проводитися кожні два цикли (8 тижнів) протягом перших шести циклів (24 тижні), а потім кожні три цикли (12 тижнів) після цього до візиту закінчення лікування; ці обстеження можна проводити протягом 7 днів до закінчення відповідних циклів. Припускаючи, що пацієнт залишається клінічно стабільним, у нього немає прогресування захворювання, пов'язаного з імунною системою, (irPD) і немає неприйнятної токсичності, яка вимагає остаточного припинення застосування досліджуваного лікарського засобу, лікування антитілом Х може тривати до 24 циклів (~ 2 роки). Після введення останньої дози досліджуваного лікарського засобу всі пацієнти будуть спостерігатися протягом 30-денного періоду подальшого спостереження для оцінки безпеки і кожні 6 місяців протягом 2-річного періоду подальшого спостереження для оцінки виживаності.

У когорту рака ендометрію включені як мінімум 10 пацієнтів із захворюванням з високою мікросателітною нестабільністю (MSI-H), дефіцитом корекції неспарених основ (dMMR) та/або захворюванням, позитивним за мутацією в екзонуклеазному домені ДНК-полімерази ϵ (POLE).

Пацієнти отримують 3 мг/кг антитіла Х один раз на 2 або 4 тижні (або 1 мг/кг Q2W, або 10 мг/кг Q2W, або 10 мг/кг Q4W) в дозах, установлених для цієї схеми застосування з фази підвищення дози в дослідженні. Пацієнти в когортах із фіксованою дозою отримують антитіло Х або в дозі 500 мг Q4W, або 750 мг Q4W.

Приклад 4. Дослідження фази 1 за оцінкою безпеки, переносимості та фармакокінетики антитіла Х у пацієнтів зі злоякісним новоутворенням

Це дослідження являє собою відкрите дослідження фази 1, дослідження з підвищенням дози і розширенням когорти, розроблене для визначення характеристик безпеки, переносимості, ФК, ФД, імуногенності та попередньої протипухлинної активності антитіла Х, яке вводиться в/в кожні два, три або чотири тижні, у пацієнтів із рецидивуючими/рефрактерними, неоперабельними місцевопоширеними або метастатичними солідними пухлинами.

Дослідження складається з двох фаз: фази підвищення дози і фази розширення когорти.

Усім пацієнтам, включеним у дослідження, антитіло Х вводять шляхом внутрішньовенної інфузії протягом 60 хвилин. Для цілей визначення інтервалу лікування протягом цього дослідження 1 цикл визначається як 28 днів або 4 тижні для пацієнтів, які отримують дози Q2W або Q4W. Для пацієнтів, які отримують дози Q3W, 1 цикл визначається як 21 день або 3 тижні. Як для фази підвищення дози, так і для фази розширення когорти оцінки пухлини будуть проводитися кожні 8 тижнів протягом перших 24 тижнів для пацієнтів, які отримували дози Q2W або Q4W, і кожні 9 тижнів протягом перших 27 тижнів для пацієнтів, які отримували дози Q3W, а потім кожні 12 тижнів до візиту закінчення лікування; ці обстеження можна проводити протягом 7 днів до закінчення відповідних циклів. Припускаючи, що пацієнт залишається клінічно стабільним, у нього немає клінічного прогресування і немає неприйнятної токсичності, яка

вимагає остаточного припинення застосування досліджуваного лікарського засобу, лікування антитілом X може тривати до 2 років. Після введення останньої дози досліджуваного лікарського засобу всі пацієнти будуть спостерігатися протягом 30-денного періоду подальшого спостереження для оцінки безпеки і кожні 6 місяців протягом 2-річного періоду подальшого спостереження для оцінки виживаності.

У фазі підвищення дози антитіло X будуть оцінювати з послідовним підвищенням доз. Рівні доз антитіла X, які необхідно оцінити, включають 1 мг/кг, 3 мг/кг і 10 мг/кг з інтервалом один раз на два тижні (Q2W) або один раз на чотири тижні (Q4W). Наприклад, пацієнти можуть отримувати антитіло X в дозах 1 мг/кг Q2W, 3 мг/кг Q2W, 3 мг/кг Q4W, 10 мг/кг Q2W або 10 мг/кг Q4W в дозах, установлених для цієї схеми застосування з фази підвищення дози в дослідженні.

Фаза розширення когорти включатиме пухлиноспецифічні когорти, включно з пацієнтами з раком ендометрію (недиференційованим, із високим MSI і dMMR), саркомою м'яких тканин, недрібноклітинним раком легені, раком шийки матки, і когорти з будь-якою гістологією пухлин (пухлино-неспецифічні). Рівні доз антитіла X, які необхідно оцінити, включають 3 мг/кг один раз на два тижні, наприклад, 3 мг/кг Q2W, і введення постійних/фіксованих доз антитіла X в 375 мг, 500 мг і 750 мг один раз на три тижні або чотири тижні, наприклад, 375 мг Q3W, 500 мг Q4W або 750 мг Q4W.

ІНШІ ВАРІАНТИ ЗДІЙСНЕННЯ

Хоча цей винахід був викладений у поєднанні з його детальним описом, вищенаведений опис призначений для ілюстрації, а не для обмеження обсягу цього розкриття, який визначається обсягом прикладеної формули винаходу. Інші аспекти, переваги і зміни знаходяться в рамках обсягу прикладеної формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> INCYTE CORPORATION
MACROGENICS, INC.

<120> АНТИТІЛА ДО PD-1 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 20443-0565WO1

<140> PCT/US2019/037750

<141> 18.06.2019

<150> 62/756319

<151> 06.11.2018

<150> 62/687673

<151> 20.06.2018

<160> 11

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

5 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
10 210 215 220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

15 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285
<210> 2

20 <211> 445
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> джерело

25 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
поліпептид»
<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

30 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
35 50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val 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

40 Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
45 130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

50 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
55 210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

60 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 5 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 10 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 15 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 20 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 <210> 3
 25 <211> 218
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 30 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид»
 <400> 3
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 40 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 45 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 50 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 55 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 60 210 215

<210> 4
 <211> 119
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид»
 <400> 4
 10 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 15 35 40 45
 Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 25 115
 <210> 5
 <211> 111
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид»
 <400> 5
 35 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 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 40 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 45 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 6
 50 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 55 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид»
 <400> 6
 Ser Tyr Trp Met Asn
 1 5
 60 <210> 7

<211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 5 <221> джерело
 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
 пептид»
 <400> 7
 Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys
 10 1 5 10 15
 Asp

 <210> 8
 <211> 10
 15 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
 20 пептид»
 <400> 8
 Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 9
 25 <211> 16
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 30 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
 пептид»
 <400> 9
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn Trp
 1 5 10 15
 35 <210> 10
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 40 <221> джерело
 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
 пептид»
 <400> 10
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 45 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка=«Опис штучної послідовності: Синтетичний
 пептид»
 <400> 11
 55 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
 1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування карциноми з клітин Меркеля у суб'єкта-людини, який потребує цього, причому спосіб включає введення суб'єкту-людині терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з PD-1 людини, де:
 - (i) антитіло містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, і де важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і
 - (ii) антитіло вводять в дозі 500 мг один раз на 4 тижні.
2. Спосіб за п. 1, за яким антитіло вводять внутрішньовенно.
3. Спосіб за п. 1 або 2, за яким антитіло вводять шляхом безперервної інфузії.
4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-3, за яким антитіло вводять суб'єкту-людині у композиції, що містить від близько 1 до 100 мг/мл або від близько 10 до 100 мг/мл, або від близько 50 до 250 мг/мл, або від близько 100 до 150 мг/мл, або від близько 100 до 250 мг/мл антитіла.
5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, за яким антитіло виробляється в клітинах ссавців.
6. Спосіб за п. 5, за яким антитіло виробляється в клітинах яєчника китайського хом'яка (CHO).
7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, за яким карцинома з клітин Меркеля є метастатичною карциномою з клітин Меркеля.