

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992886 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.12

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.31

(54) АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PDL1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/513,937; 62/534,950; 62/555,598;
62/657,567

(72) Изобретатель:
Хамфри Рейчел, Карман Лори, Уилл
Маггиас, Чжэн Бэйяо, Балински Кейт
(US)

(32) 2017.06.01; 2017.07.20; 2017.09.07;
2018.04.13

(33) US

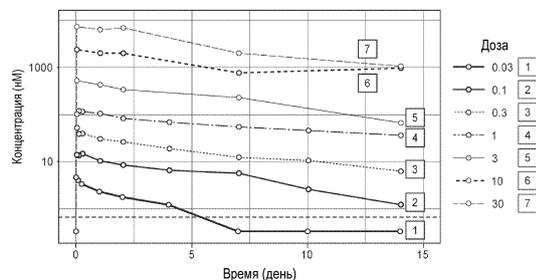
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(86) PCT/US2018/035508

(87) WO 2018/222949 2018.12.06

(71) Заявитель:
САЙТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(57) Изобретение в целом относится к активируемым антителам, которые специфично связываются с PDL1, и к способам получения и применения таких активируемых антител против PDL1 по различным терапевтическим, диагностическим и профилактическим показаниям.



A1

201992886

201992886

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560199EA/032

АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PDL1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/513,937, поданной 1 июня 2017 года, предварительной заявки на патент США 62/534,950, поданной 20 июля 2017 года, предварительной заявки на патент США 62/555,598, поданной 7 сентября 2017 года, и предварительной заявки на патент США 62/657,567, поданной 13 апреля 2018 года, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей их полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к определенным схемам применения для введения активируемых антител против PDL1 с целью лечения рака.

Уровень техники

[0003] Терапии, основанные на применении антител, доказали свою эффективность при лечении нескольких заболеваний, однако в некоторых случаях токсическое действие, обусловленное широкой экспрессией мишени, ограничивало их терапевтическую эффективность. Кроме того, терапия, основанная на применении антител, продемонстрировала другие ограничения, такие как быстрое выведение из кровотока после введения.

[0004] В области низкомолекулярных терапевтических средств были разработаны стратегии получения пролекарств активного химического соединения. Такие пролекарства вводят в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство метаболизируется *in vivo* в активное соединение. Такие стратегии получения пролекарств могут обеспечивать повышенную селективность лекарственного средства в отношении его предполагаемой мишени и уменьшение побочных действий.

[0005] Таким образом, в области терапевтических средств на основе антител сохраняется потребность в антителах, которые воспроизводят требуемые характеристики низкомолекулярного пролекарства.

Сущность изобретения

[0006] В различных аспектах изобретения предложены способы лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у индивида путем введения индивиду внутривенно, в дозе приблизительно от 0,3 мг/кг до 30 мг/кг, активируемого антитела против PDL1. Активируемое антитело содержит антитело (АВ), которое специфично связывается с человеческим PDL1. АВ имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:235; и переменную область легкой цепи, содержащую

определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:228; расщепляемую часть (CM), соединенную с АВ, где CM представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и маскирующую часть (MM), соединенную с CM.

[0007] Также в изобретение включены способы лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у индивида путем введения индивиду внутривенно, в фиксированной дозе от приблизительно от 24 до 2400 мг, активируемого антитела против PDL1, где активируемое антитело содержит антитело (AB), которое специфично связывается с человеческим PDL1, где АВ включает переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:235; и переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:228; расщепляемую часть (CM), соединенную с АВ, где CM представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и маскирующую часть (MM), соединенную с АВ.

[0008] В другом аспекте изобретения предложено активируемое антитело против PDL1, содержащее антитело (AB), которое специфично связывается с человеческим PDL1. АВ имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:235; и переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:228; расщепляемую часть (CM), соединенную с АВ, где CM представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и маскирующую часть (MM), соединенную с CM, для применения при лечении, облегчении симптома или задержке прогрессирования рака у индивида, и где активируемое антитело вводят внутривенно в дозе приблизительно

от 0,3 мг/кг до 30 мг/кг

[0009] В другом аспекте изобретения предложено активируемое антитело против PDL1, содержащее антитело (АВ), которое специфично связывается с человеческим PDL1. АВ имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:235; и переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:228, расщепляемую часть (СМ), соединенную с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и маскирующую часть (ММ), соединенную с СМ, для применения при лечении, облегчении симптома или задержке прогрессирования рака у индивида, и где активируемое антитело вводят внутривенно в фиксированной дозе приблизительно от 24 до 2400 мг.

[0010] ММ ингибирует связывание АВ с человеческим PDL1, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии. В некоторых аспектах ММ имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63.

[0011] В некоторых аспектах СМ имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:377.

[0012] АВ имеет переменную область тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:46, и переменную область легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:58 или SEQ ID NO:137.

[0013] В других аспектах активируемое антитело имеет легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1008, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:432.

[0014] В альтернативе активируемое антитело имеет легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:428, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:432.

[0015] Доза составляет приблизительно от 3 мг/кг до 10 мг/кг. Доза составляет приблизительно от 3 мг/кг до 15 мг/кг. Доза составляет 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 6 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг или 30 мг/кг.

[0016] Фиксированная доза составляет 240 мг, 480 мг, 800 мг, 1200 мг, 2400 мг.

[0017] Активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 7-28 дней. Например, активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 14 дней или 21 день.

[0018] Активируемое антитело вводят в качестве монотерапии. В альтернативе активируемое антитело вводят в качестве компонента комбинированной терапии.

Комбинированная терапия включает введение дозы антитела против CTLA-4 или ингибитора B-RAF

[0019] Антителом против CTLA-4 является, например, ипилимумаб. Антитело против CTLA-4 вводят внутривенно. Антитело против CTLA-4 вводят в дозе 3 мг/кг, 6 мг/кг или 10 мг/кг. В альтернативе антитело против CTLA-4 вводят в фиксированной дозе 240 мг, 480 мг или 800 мг.

[0020] Ингибитором B-RAF является вемурафениб. Ингибитор B-RAF вводят перорально. Ингибитор B-RAF вводят в дозе 960 мг или в дозе 875 мг. Активируемое антитело и ингибитор B-RAF вводят в течение одинакового периода времени.

[0021] В некоторых аспектах дозу ингибитора B-RAF вводят два раза в день. В других аспектах вводят по меньшей мере по 4 дозы активируемого антитела и ингибитора B-RAF.

[0022] В некоторых аспектах множество доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 вводят в течение первого периода времени, после чего вводят множество доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение второго периода времени.

[0023] В других аспектах активируемое антитело и дозу антитела против CTLA-4 вводят параллельно в качестве комбинированной терапии, раз в 21 день в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии каждые 14 дней.

[0024] В еще одном аспекте множество доз активируемого антитела в качестве монотерапии вводят в течение первого периода времени с последующим параллельным введением множества доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени.

[0025] В еще одном аспекте множество доз активируемого антитела вводят в качестве монотерапии в течение первого периода времени, затем множество доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 вводят в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени, и множество доз активируемого антитела в качестве монотерапии вводят в течение третьего периода времени.

[0026] В других аспектах активируемое антитело вводят в качестве монотерапии каждые 14 дней в количестве 4 доз с последующим введением дозы активируемого антитела и дозы антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии раз в 21 день, в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии каждые 14 дней.

[0027] Злокачественная опухоль представляет собой распространенную, неоперабельную солидную опухоль или лимфому. Например, распространенная неоперабельная опухоль относится к опухоли PDL1-чувствительного типа.

[0028] Злокачественная опухоль представляет собой карциному, такую как плоскоклеточная карцинома.

[0029] Злокачественная опухоль является, например, плоскоклеточной карциномой анального канала, базальноклеточной карциномой, раком мочевого пузыря, раком костей,

колоректальной карциномой, раком молочной железы, карциноидом, кастрационно-резистентным раком предстательной железы (КРРПЖ), карциномой шейки матки, раком толстой и прямой кишки (CRC), раком толстой кишки, плоскоклеточной карциномой кожи, раком эндометрия, раком пищевода, карциномой желудка, раком гастроэзофагеального перехода, глиобластомой/смешанной глиомой, глиомой, раком головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномой, гемобластозом, раком печени, раком легкого, меланомой, карциномой из клеток Меркеля, множественной миеломой, раком носоглотки, остеосаркомой, раком яичника, раком поджелудочной железы, перитонеальной карциномой, недифференцированной плеоморфной саркомой, раком предстательной железы, карциномой прямой кишки, раком почки, саркомой, карциномой слюнных желез, плоскоклеточной карциномой, раком желудка, раком яичка, карциномой тимуса, эпителиальной опухолью тимуса, тимомой, раком щитовидной железы, урогенитальным раком, уротелиальным раком, карциномой матки или саркомой матки.

[0030] Злокачественная опухоль представляет собой опухоль с высокой мутационной нагрузкой (hTMB).

[0031] Рак молочной железы является трижды негативным раком молочной железы или эстроген-рецептор-положительным раком молочной железы.

[0032] Гемобластоз является лимфомой или лейкозом. Лимфома, например, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина или ВЭБ-ассоциированная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома.

[0033] Рак является меланомой.

[0034] Колоректальная карцинома является, например, раком тонкой кишки или аденокарциномой тонкой кишки. Рак толстой кишки является аденокарциномой толстой кишки,

[0035] Рак легкого является, например, немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) или мелкоклеточным раком легкого. НМРЛ является неплоскоклеточным НМРЛ или плоскоклеточным НМРЛ.

[0036] Рак предстательной железы является мелкоклеточным нейроэндокринным раком предстательной железы.

[0037] Рак почки является почечно-клеточной карциномой или саркомой почки.

[0038] Предпочтительно рак является недифференцированной плеоморфной саркомой, аденокарциномой тонкой кишки, карциномой из клетки Меркеля, карциномой тимуса, плоскоклеточной карциномой анального канала, плоскоклеточной карциномой кожи или трижды негативным раком молочной железы.

[0039] Пациент демонстрирует одну или более следующих характеристик: ранее не подвергался лечению ингибитором PD-1/PDL1, ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4, положительный статус мутации BRAF^{V600E}, ранее не подвергался лечению ингибитором BRAF, PDL1-положительный, PDL1-неизвестный, ранее проходил лечение ингибитором PD1/PDL1, для индивида недоступно другое стандартное лечение, терапия ингибитором PD1/PDL1 не одобрена для формы рака индивида, ранее проходил

предыдущее лечение ингибитором PD-1/PDL1, где лечение ингибитором PD-1/PDL1 было прекращено по иным причинам кроме токсического действия, и где индивид ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4, не подвергался иммунотерапии.

[0040] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такие же значения, под которыми их обычно понимают специалисты в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В настоящем описании формы единственного числа включают множества, если из контекста прямо не следует иное. Хотя материалы и методы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, подходящие материалы и методы описаны ниже. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, методы и примеры являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения.

[0041] Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

[0042] ФИГ. 1А является схематическим изображением схемы исследования для исследования в Примере 2, где "АА" представляет собой активируемое антитело против PDL1, указанное в настоящем документе как PL07-2001-C5H9v2, которое включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:432 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:428.

[0043] ФИГ. 1В является схематическим изображением схемы исследования для исследования в Примере 2, где "АА" представляет собой активируемое антитело против PDL1, указанное в настоящем документе как PL07-2001-C5H9v2, которое включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:432 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:428. По сравнению с ФИГ. 1А это схематическое изображение включает дополнительную необязательную Часть А2 в схеме исследования.

[0044] На ФИГ. 2 показана серия графиков, на которых представлено обнаружение расщепленных и интактных активируемых антител против PD-L1 в образцах опухоли и плазмы, выполненное с помощью системы WES (ProteinSimple, San Jose, CA) при условиях, подобных описанным в руководстве к приборам WES.

[0045] ФИГ. 3А и 3В являются серией графиков, на которых представлен скрининг антиидиотипических (anti-id) клонов PL07-2001-C5H9v2 против 37% одноплечевого активированного активируемого антитела в концентрации 0,11, 0,33 и 1 мкг/мл в человеческой плазме 1:100. ФИГ. 3А - электрофореграмма, на которой показано обнаружение 17G1 снижающейся концентрации одноплечевого активированного PL07-2001-C5H9v2 (1, 0,33 и 0,11 мкг/мл, указанного на ФИГ. как СМЕСЬ АА). На ФИГ. 3В продемонстрирован относительный процент активации лучших 6 клонов одноплечевого активированного активируемого антитела. Относительный процент активации сохраняется при разных концентрациях. Клоны 21:10 и 27C1 имеют более низкую

аффинность, что привело к отсутствию данных для концентраций 0,11 мкг/мл.

[0046] ФИГ. 4А, 4В, 4С и 4D являются серией графиков, на которых показано, что антитело, указанное в настоящем документе как 17G1, обладает высокой специфичностью в отношении активируемого антитела (AA) PL07-2001-C5H9v2. Специфичность 17G1 оценивали на Wes при введении 160 нг/мл одноплечевого активированного PL07-2001-C5H9v2 (активированного AA) либо в человеческую плазму (ФИГ. 4С), либо в лизаты опухолей легких (ФИГ. 4D).

[0047] ФИГ. 5А и 5В являются серией графиков, на которых показано специфичное обнаружение терапевтических активируемых антител (AA) с помощью селективных антиидиотипических антител. На ФИГ. 5А продемонстрировано обнаружение активируемого антитела против PDL1, указанного в настоящем документе как PL07-2001-C5H9v2, в плазме мышей, получавших 10 мг/кг PL07-2001-C5H9v2, при использовании A110UK (антитела козы против IgG человека (H&L), адсорбированного против иммуноглобулина обезьяны, без метки) производства American Qualex (доступно в сети по адресу aqsp.com/). На ФИГ. 5В продемонстрировано обнаружение PL07-2001-C5H9v2 в плазме мышей, получавших 0,1 мг/кг PL07-2001-C5H9v2, при использовании антиидиотипического антитела 17G1.

[0048] ФИГ. 6А и ФИГ. 6В являются серией графиков, на которых показана предпочтительная активация терапевтических активируемых антител (AA) в опухоли по сравнению с плазмой, обнаруживаемых в ксенотрансплантатной модели опухоли. Мыши с ксенотрансплантатами MDA-MB-231 получали 1 мг/мл активируемого антитела против PDL1, указанного в настоящем документе как PL07-2001-C5H9v2. Образцы опухолей и плазмы собирали в день 4. На ФИГ. 6А и 6В продемонстрирован анализ гомогената опухоли и образцов плазмы с применением метода иммуноанализа с помощью капиллярного электрофореза на основе Wes (ProteinSimple) согласно настоящему изобретению.

[0049] ФИГ. 7А и 7В являются серией графиков, на которых показана предпочтительная активация терапевтических активируемых антител в опухоли по сравнению с плазмой, обнаруживаемых в другой ксенотрансплантатной модели опухоли. Мыши с ксенотрансплантатами SAS получали 0,1 мг/кг активируемого антитела против PDL1, указанного в настоящем документе как PL07-2001-C5H9v2. На ФИГ. 7А и 7В продемонстрирован анализ гомогената опухолей и образцов плазмы применением метода иммуноанализа с помощью капиллярного электрофореза на основе Wes (ProteinSimple) согласно настоящему изобретению.

[0050] ФИГ. 8А и 8В являются графиками средней концентрации в плазме интактного (нерасщепленного) PL07-2001-C5H9v2 (нМ) и общей концентрации (т.е. интактного и расщепленного) PL07-2001-C5H9v2, соответственно, в зависимости от времени (день) после введения до 30 мг/кг раз в 2 недели в Когортах А и А2 Цикла 1 Дозы 1. Пунктирная линия обозначает предел количественного обнаружения (LLOQ) в анализе, и в этом аспекте только данным ниже LOQ (BLOQ) присвоено значение LOQ/2.

[0051] На ФИГ. 9А показано лучшее процентное изменение относительно исходных показателей целевых очагов после введения PL07-2001-C5H9v2. ФИГ. 9В является лепестковой диаграммой, на которой показано изменение целевого очага (%) в зависимости от времени после введения PL07-2001-C5H9v2. Сокращения: КР, кастрационно-резистентный; ЭР+ РМЖ, эстроген-рецептор-положительный рак молочной железы; ПРГШ, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; РD, прогрессирующее заболевание; РR, частичный объективный ответ; RECIST, Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях; SD, стабилизация заболевания; ТНРМЖ, трижды негативный рак молочной железы.

[0052] На ФИГ. 10А показано лучшее процентное изменение относительно исходных показателей целевых очагов после введения комбинации PL07-2001-C5H9v2+ипилимумаб. ФИГ. 10В является лепестковой диаграммой, на которой показано изменение целевого очага (%) в зависимости от времени после введения PL07-2001-C5H9v2. Сокращения: CR, полный объективный ответ; ЭР+ РМЖ, эстроген-рецептор-положительный рак молочной железы; ПРГШ, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; РD, прогрессирующее заболевание; РR, частичный объективный ответ, RECIST, Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях; ПКК, плоскоклеточная карцинома; МККЛ, мелкоклеточная карцинома легкого; SD, стабилизация заболевания; ТНРМЖ, трижды негативный рак молочной железы.

Подробное описание изобретения

[0053] В настоящем изобретении предложены способы лечения рака путем введения активируемого антитела против PDL1. В частности, изобретение основано на результатах первого исследования безопасности и эффективности активируемого антитела с участием человека. Исследование с повышением дозы проводили для оценки безопасности и эффективности PL07-2001-C5H9v2 в качестве монотерапии или в комбинации с ипилимумабом. PL07-2001-C5H9v2 представляет собой активируемое протеазами антитело против PDL1. PL07-2001-C5H9v2 активируется под действием опухолеассоциированных протеаз и, как было показано, неактивно в кровотоке.

[0054] Пациентам с метастатическими или распространенными неоперабельными солидными опухолями или лимфомой внутривенно вводили 0,03-30 мг/кг PL07-2001-C5H9v2 каждые три недели. Среди пациентов с подходящими для оценки данными (n=19) целевые очаги уменьшились относительно исходных показателей у 8 пациентов (42%). Целевые очаги уменьшились относительно исходных показателей при уровнях дозы ≥ 3 мг/кг у 6/10 пациентов (60%).

[0055] Проценты пациентов с контролируемым заболеванием составляли 45% среди всех пациентов, получавших от 0,03 до 30 мг/кг PL07-2001-C5H9v2. Среди пациентов, получавших дозу по меньшей мере 10 мг/кг, проценты пациентов с контролируемым заболеванием составляли больше 66%. Неожиданно анализ фармакокинетики (ФК) продемонстрировал, что PL07-2001-C5H9v2 циркулирует в плазме преимущественно в неактивированной форме, и ФК лишь минимально снижается при

адресном распределении лекарственного средства.

[0056] Активируемые антитела против PDL1, описанные в настоящем документе, преодолевают ограничение терапевтических средств на основе антител, в частности терапевтических средств на основе антител, которые, как известно, токсичны, по меньшей мере, в некоторой степени, *in vivo*. Мишень-опосредованное токсическое действие составляет главное ограничение при разработке терапевтических антител. Активируемые антитела против PDL1, предложенные в настоящем документе, созданы с возможностью преодоления токсичности, связанной с ингибированием мишени в нормальных тканях при воздействии обычных терапевтических антител. Важно то, что такие активируемые антитела против PDL1 остаются маскированными до протеолитической активации в очаге заболевания.

[0057] Активируемые антитела против PDL1

[0058] Активируемые антитела, применяемые в композициях и способах настоящего изобретения, были получены и исследованы с применением способов, раскрытых в публикации PCT WO 2016/149201, содержание которой включено в настоящем документе посредством отсылки во всей своей полноте.

[0059] Активируемые антитела против PDL1 включают антитело, которое специфично связывает PDL1, соединенное с маскирующей частью (ММ), при этом такое соединение с ММ снижает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать PDL1. ММ соединена через последовательность, которая включает субстрат для протеазы, например, протеазы, которая локализована с PDL1 в целевом участке лечения у индивида.

[0060] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела включают антитело (АВ), которое модифицировано частью ММ, и также включает одну или более расщепляемых частей (СМ). Такие активируемые антитела демонстрируют активируемое/включаемое связывание с мишенью АВ. Активируемые антитела обычно включают антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированные или соединенные с маскирующей частью (ММ) и модифицируемой или расщепляемой частью (СМ). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, которая служит в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. В предпочтительных вариантах осуществления АВ имеет две тяжелых цепи и две легких цепи.

[0061] Элементы активируемых антител расположены так, чтобы ММ и СМ были помещены таким образом, чтобы в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени, АВ связывало мишень, тогда как в том случае, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, специфичное связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано. Специфичное связывание АВ с его мишенью может быть уменьшено вследствие ингибирования или маскирования посредством ММ способности АВ специфично связывать свою мишень.

[0062] Активируемые антитела могут быть предоставлены в различных структурных конфигурациях. Примеры формул активируемых антител приведены ниже. В частности, предполагается, что порядок расположения АВ, ММ и СМ, от N-конца к С-концу, в активируемом антителе может быть изменен на обратный. Следует отметить, что, хотя ММ и СМ обозначены как отдельные компоненты в формулах ниже, во всех примерах осуществления (в том числе в формулах), раскрытых в настоящем документе, предусмотрено, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, так, что СМ полностью или частично содержится в ММ.

[0063] Например, активируемые антитела могут быть представлены следующей формулой (в порядке от амино- (N) концевой области к карбокси- (C) концевой области):

(ММ)-(СМ)-(АВ)

(АВ)-(СМ)-(ММ)

где ММ - маскирующая часть, СМ - расщепляемая часть, и АВ - антитело. Кроме того, представленные выше формулы предусматривают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или С-конце относительно элементов активируемых антител.

[0064] Во многих вариантах осуществления изобретения может потребоваться введение в конструкцию активируемого антитела одного или более линкеров, например гибких линкеров, для обеспечения гибкости в одном или более соединениях ММ-СМ и/или СМ-АВ. Например, АВ, ММ и/или СМ могут не содержать достаточного числа остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, в особенности Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения требуемой гибкости. Таким образом, переключаемый фенотип таких конструкций активируемых антител может быть улучшен при введении одной или более аминокислот с получением гибкого линкера. Кроме того, как описано ниже, в тех случаях, когда активируемое антитело представлено в виде конформационно ограниченной конструкции, гибкий линкер может быть функционально встроен для облегчения образования и сохранения циклической структуры в нерасщепленном активируемом антителе.

[0065] Например, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает одну из следующих формул (где формула ниже представляет аминокислотную последовательность в направлении от N- к С-концу или в направлении от С- к N-концу):

(ММ)-L1-(СМ)-(АВ)

(ММ)-(СМ)-L2-(АВ)

(ММ)-L1-(СМ)-L2-(АВ)

где ММ, СМ и АВ имеют определенное выше значение; где L1 и L2 независимо и необязательно присутствуют или отсутствуют и являются одинаковыми или разными гибкими линкерами, которые включают по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, в приведенных выше формулах предусмотрены дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть помещены на N-конце или С-конце относительно элементов активируемых антител. Примеры

включают, без ограничения перечисленными, направленно взаимодействующие части (например, лиганд рецептора клетки, присутствующей в целевой ткани) и части, увеличивающие полупериод существования в сыворотке (например, полипептиды, которые связывают сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA))).

[0066] В случае, когда АВ модифицировано ММ и находится в присутствии мишени, специфичное связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано по сравнению со специфичным связыванием АВ, не модифицированного ММ, или со специфичным связыванием исходного АВ с мишенью. При сравнении со связыванием АВ, не модифицированного ММ, или со связыванием исходного АВ с мишенью, способность АВ связывать мишень при его модификации ММ может быть уменьшена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или больше, при измерении в анализе *in vivo* или *in vitro*.

[0067] С другой стороны аффинность связывания АВ, модифицированного ММ и СМ, в отношении мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2,500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или больше, или в пределах 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-10000000 или 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного ММ и СМ, или исходного АВ в отношении мишени.

[0068] Как используется в настоящем изобретении, термин расщепленное состояние относится к состоянию активируемых антител после модификации СМ по меньшей мере одной протеазой. Термин нерасщепленное состояние при использовании в настоящем документе относится к состоянию активируемых антител в отсутствие расщепления СМ протеазой. Как обсуждалось выше, термин "активируемые антитела" используется в настоящей заявке для обозначения активируемого антитела как в его нерасщепленном (нативном) состоянии, так и в его расщепленном состоянии. Среднему специалисту в данной области будет очевидно, что в некоторых вариантах осуществления расщепленное активируемое антитело может не иметь ММ вследствие расщепления СМ протеазой, что приводит к высвобождению, по меньшей мере, ММ.

[0069] Под активируемым или включаемым подразумевается, что активируемое антитело демонстрирует первый уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, маскированном или нерасщепленном состоянии (то есть в первой конформации), и второй уровень связывания с мишенью в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (то есть во второй конформации), где второй уровень связывания с мишенью превышает первый уровень связывания. Как правило, доступ мишени к АВ активируемого антитела является более

высоким в присутствии расщепляющего средства, способного расщеплять СМ, чем при отсутствии такого расщепляющего средства. Таким образом, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание АВ с мишенью ингибировано, и при этом АВ может быть маскировано от связывания с мишенью (то есть первая конформация является такой, что АВ не может связываться с мишенью), а в расщепленном состоянии АВ не ингибировано или не маскировано от связывания с мишенью.

[0070] СМ и АВ активируемых антител выбраны таким образом, что АВ представляет собой связывающую часть для данной мишени, а СМ представляет собой субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза колокализована с мишенью в целевом участке лечения у индивида. При использовании в настоящем описании колокализованный относится к присутствию в том же участке или в относительной близости от него. В некоторых вариантах осуществления протеаза расщепляет СМ с получением активированного антитела, которое связывается с мишенью, расположенной вблизи от участка расщепления. Активируемые антитела, раскрытые в настоящем документе, находят конкретное применение, когда, например, протеаза, способная расщеплять участок в СМ, присутствует на относительно более высоких уровнях в, или в непосредственной близости от, содержащей мишень ткани в участке лечения, чем в ткани в областях, не подвергаемых лечению (например, в здоровой ткани). В некоторых вариантах осуществления СМ согласно настоящему изобретению также расщепляется одной или более другими протеазами. В некоторых вариантах осуществления это - одна или более других протеаз, которые колокализованы с мишенью, и которые производят расщепление СМ *in vivo*.

[0071] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают снижение токсического действия и/или нежелательных побочных действий, которые в ином случае могут возникать в результате связывания АВ в участках, в которых лечение не предусмотрено, если связывание АВ с мишенью не было бы маскировано или иным образом ингибировано.

[0072] Как правило, активируемое антитело может быть создано путем выбора представляющего интерес АВ и конструирования остальной части активируемого антитела таким образом, чтобы при конформационном ограничении ММ обеспечивала маскирование АВ или уменьшение связывания АВ со своей мишенью. Критерии структурного конструирования можно учитывать для получения указанного функционального признака.

[0073] Для специфичного расщепления ферментом, осуществляется контакт между ферментом и СМ. Когда активируемое антитело, включающее АВ, соединенное с ММ и СМ, находится в присутствии мишени и достаточной ферментативной активности, СМ может расщепляться. Достаточная ферментативная активность может относиться к способности фермента осуществлять контакт с СМ и вызывать расщепление. Можно легко предположить, что фермент может находиться вблизи от СМ, но не сможет вызывать расщепление из-за других клеточных факторов или белковой модификации

фермента.

[0074] В некоторых вариантах осуществления полупериод существования активируемого антитела в сыворотке более длительный, чем у соответствующего антитела; например, рК активируемого антитела больше, чем у соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления полупериод существования активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 15 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления полупериод существования активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 12 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления полупериод существования активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 11 дней при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления полупериод существования активируемого антитела в сыворотке составляет по меньшей мере 10 дней при введении в организм.

[0075] Примерное активируемое антитело включает антитело (AB), которое специфично связывается с человеческим PDL1, имеющее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:246 и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:235; и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:228; расщепляемую часть (CM), соединенную с AB, где CM представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и маскирующую часть (MM), соединенную с CM. Например, CM представляет собой ISSGLLSGRSDNH, (SEQ ID NO:377). Например, MM представляет собой GIALCPSHFCQLPQT (SEQ ID NO:63).

[0076] Примерное активируемое антитело против PDL включает антитело (AB), которое специфично связывается с человеческим PDL1. AB включает две тяжелых цепи антитела, каждая из которых имеет вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:235; и две легких цепи антитела, каждая из которых имеет вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDRL2) с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:228; два пептида маскирующей части (MM1); и два пептида расщепляемой части (CM1), причем каждый CM1 является субстратом для протеазы. Каждый MM1 соединен в направлении от N-конца к C-концу CM1, с получением двух пептидов MM1-CM1, где C-конец каждого пептида MM1-CM1 соединен с N-концом каждой легкой цепи АВ. Например, CM представляет собой ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO:377). Например, MM представляет собой GIALCPSHFCQLPQT (SEQ ID NO:63).

[0077] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 имеет переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO:137 (которые включают CM SEQ ID NO:377, MM SEQ ID NO:63 и VL SEQ ID NO:58).

[0078] В других вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 имеет тяжелую цепь SEQ ID NO:432 и легкую цепь SEQ ID NO:428 (которые включают CM SEQ ID NO:377, MM SEQ ID NO:63, VL SEQ ID NO:58 и каппа константный домен).

[0079] Предпочтительные активируемые антитела против PDL1, применяемые в способах изобретения, включают PL07-2001-C5H9v2, которое включает переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO:137. Полноразмерная тяжелая и легкая цепь PL07-2001-C5H9v2 включают SEQ ID NO:432 и SEQ ID NO:428, соответственно.

[0080] Дополнительное активируемое антитело против PDL1, применимое в способах изобретения, включает PL07-2001-C5H9v2-WO, которое включает переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO:58. Полноразмерная тяжелая и легкая цепь PL07-2001-C5H9v2-WO включают SEQ ID NO:432 и SEQ ID NO:1008, соответственно.

[0081] Последовательность переменной области тяжелой цепи PL07-2001-C5H9v2

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRN
GIVTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:46)

[0082] Последовательность переменной области легкой цепи PL07-2001-C5H9v2
QGQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:137)

[0083] Последовательность переменной области легкой цепи PL07-2001-C5H9v2-WO

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLS
ASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:)

[0084] Последовательность тяжелой цепи PL07-2001-C5H9v2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRN
GIVTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAF₂WDYWGQGT
LTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT₂KTYTCNV₂DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSV₂MHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:432)

[0085] Последовательность легкой цепи PL07-2001-C5H9v2

QGQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGSSGGLLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGD₂RVTITCRASQSISSYL₂NWYQ₂QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ₂QDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFY₂PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:428)

[0086] Последовательность легкой цепи PL07-2001-C5H9v2-WO (без линкера)

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGSSGGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLS
ASVGD₂RVTITCRASQSISSYL₂NWYQ₂QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISLQPEDFATYYCQ₂QDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFY₂PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1008)

[0087] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:46, 137, XX, 432, 428 и 1008.

[0088] Антитела против PDL1

[0089] Примерные антитела против PDL1, подходящие при конструировании активируемого антитела против PDL1, описанного в настоящем документе, включают антитела C5H9 v2, C5H9, C5B10, C5E10 и G12H9. CDR-области VH и VL C5H9 v2, C5H9, C5B10, C5E10 и G12H9 показаны ниже в одной строке в Таблице 1.

[0090] Таблица 1

Название AB	VL			VH		
	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
C5H9	RASQSISSYL N (209)	YASTLQ S (227)	DNGYPS T (228)	SYAMS (212)	SSIWRNGIVTVYA DS (246)	WSAAFD Y (235)
C5B10	RASQSISSYL N (209)	YASTLQ S (227)	DNGYPS T (228)	SYAMS (212)	SSIWRNGIVTVYA DS (246)	WSAGYD Y (236)
C5E10	RASQSISSYL N (209)	YASTLQ S (227)	DNGYPS T (228)	SYAMS (212)	SSIWRNGIVTVYA DS (246)	WSKGF Y (237)
G12H9	RASQSISSYL N (209)	YASTLQ S (227)	DNGYPS T (228)	SYAMS (212)	SSIWYQGLVT ADS (247)	WSAAFD Y (235)

C5H9 v2	RASQSISSYL N (209)	AASSLQ S (215)	DNGYPS T (228)	SYAMS (212)	SSIWRNGIVTVYA DS (246)	WSAAFD Y (235)
---------	-----------------------	-------------------	-------------------	----------------	---------------------------	-------------------

[0091] Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи антител против PDL1 C5H9 v2, C5H9, C5B10, C5E10 и G12H9 показаны ниже.

[0092] Последовательность переменной области легкой цепи антитела против PDL1 C5H9v2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:58)

[0093] Последовательность переменной области тяжелой цепи антител против PDL1 C5H9 и C5H9v2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:46)

[0094] Последовательность переменной области легкой цепи антител против PDL1 C5H9, C5B10, C5E10 и G12H9

[0095]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASTLQSGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:12)

[0096] Последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против PDL1 C5B10

[0097]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAGYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:48)

[0098] Последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против PDL1 C5E10

[0099]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSKGFYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:50)

[00100] Последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против PDL1 G12H9

[00101]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMetSWVRQAPGKGLEWVSSIWYQGLVTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMetNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:52)

[00102] В некоторых вариантах осуществления антитело против PDL1 включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ

ID NO:58, 46, 12, 48, 50 и 52.

[00103] Маскирующие части

[00104] Активируемые антитела против PDL1, предложенные в настоящем документе, включают маскирующую часть (ММ). В некоторых вариантах осуществления маскирующая часть представляет собой аминокислотную последовательность (т.е. пептид), которая соединена или иным образом прикреплена к антителу против PDL1 и помещена в конструкции активируемого антитела против PDL1 таким образом, что маскирующая половина уменьшает способность антитела против PDL1 специфично связывать PDL1. Подходящие маскирующие части определяют при помощи любых известных способов. Например, пептидные маскирующие части определяют при использовании способов, описанных в публикации PCT WO 2009/025846 (Daugherty et al.), содержание которой настоящим включено посредством отсылки во всей их полноте.

[00105] ММ представляет собой полипептид длиной приблизительно 2-40 аминокислот. Предпочтительно ММ представляет собой полипептид приблизительно длиной до 40 аминокислот.

[00106] В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида ММ отличается от последовательности PDL1. В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида ММ не больше чем на 50% идентична любому PDL1. В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида ММ не больше чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% идентична PDL1.

[00107] Примеры ММ включают: YCEVSELFVLPWCMG (SEQ ID NO:208), SCLMHPHYANDYCYV (SEQ ID NO:426), LCEVLMLLQHPWCMG (SEQ ID NO:59), IACRHFMEQLPFCNH (SEQ ID NO:60), FGPRCGEASTCVPYE (SEQ ID NO:61), ILYCDSWGAGCLTRP (SEQ ID NO:62), GIALCPSHFCQLPQT (SEQ ID NO:63), DGPRCFVSGECSPIG (SEQ ID NO:64), LCYKLDYDDRSYCHI (SEQ ID NO:65), PCHPHPYDARPYCNV (SEQ ID NO:66), PCYWHPFFAYRYCNT (SEQ ID NO:67), VCYYMDWLGRNWCSS (SEQ ID NO:68), LCDLFLKREFPYCMG (SEQ ID NO:69), YLPCHFVPIGACNNK (SEQ ID NO:70), IFCHMGVVVPQCANY (SEQ ID NO:71), ACHPHPYDARPYCNV (SEQ ID NO:72), PCHPAPYDARPYCNV (SEQ ID NO:73), PCHPHAYDARPYCNV (SEQ ID NO:74), PCHPHPADARPYCNV (SEQ ID NO:75), PCHPHPYAARPYCNV (SEQ ID NO:76), PCHPHPYDAAPYCNV (SEQ ID NO:77), PCHPHPYDARPACNV (SEQ ID NO:78), PCHPHPYDARPYCAV (SEQ ID NO:79), PCHANPYDARPYCNV (SEQ ID NO:80) и PCHPHPYDARAYCNV (SEQ ID NO:81).

[00108] Предпочтительная ММ включает GIALCPSHFCQLPQT (SEQ ID NO:63).

[00109] В некоторых вариантах осуществления ММ включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:59-81, 208 и 426.

[00110] Расщепляемые части

[00111] Активируемые антитела против PDL1, предложены в настоящем

документе, включают расщепляемую часть (СМ). В некоторых вариантах осуществления расщепляемая часть включает аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, обычно внеклеточной протеазы. Подходящие субстраты определяют при использовании любых известных способов. Например, пептидные субстраты определяют при использовании способов, описанных в патенте США 7,666,817 Daugherty et al.; в патенте США 8,563,269 Stagliano et al.; и в Публикации PCT WO 2014/026136 La Porte et al., содержание каждого из которых настоящим включено посредством отсылки во всей их полноте. См. также Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics". *Biotechnol Bioeng.* 106.3 (2010): 339-46.

[00112] В некоторых вариантах осуществления протеаза, которая расщепляет СМ, активна, например апрегулирована, в пораженной ткани, при этом протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы.

[00113] В некоторых вариантах осуществления протеаза колокализирована с PDL1 в ткани, при этом протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы.

[00114] В некоторых вариантах осуществления протеаза присутствует на относительно более высоких уровнях в или в непосредственной близости от содержащей мишень ткани в целевом участке лечения или диагностики, чем в ткани в участках, в которых лечение не предусмотрено (например, в здоровой ткани), при этом протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы.

[00115] Примеры СМ включают: LSGRSDNH (SEQ ID NO:341), TGRGPSWV (SEQ ID NO:338), PLTGRSGG (SEQ ID NO:344), TARGPSFK (SEQ ID NO:340), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO:435), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO:436), TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO:437), TSGRSANP (SEQ ID NO:438), VHMP LGFLGP (SEQ ID NO:352), AVGLLAPP (SEQ ID NO:372), AQNLLGMV (SEQ ID NO:360), QNQALRMA (SEQ ID NO:359), LAAPLGLL (SEQ ID NO:371), STFPFGMF (SEQ ID NO:361), ISSGLLSS (SEQ ID NO:364), PAGLWLDP (SEQ ID NO:374), VAGRSMRP (SEQ ID NO:439), VVPEGRRS (SEQ ID NO:440), ILPRSPAF (SEQ ID NO:441), MVLGRSLL (SEQ ID NO:442), QGRAITFI (SEQ ID NO:443), SPRSIMLA (SEQ ID NO:444), SMLRSMPL (SEQ ID NO:445), ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO:377), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO:383), ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO:378), LSGRSGNH (SEQ ID NO:883), SGRSANPRG (SEQ ID NO:884), LSGRSDDH (SEQ ID NO:885), LSGRSDIH (SEQ ID NO:886), LSGRSDQH (SEQ ID NO:887), LSGRSDTH (SEQ ID NO:888), LSGRSDYH (SEQ ID NO:889), LSGRSDNP (SEQ ID NO:890), LSGRSANP (SEQ ID NO:891), LSGRSANI (SEQ ID NO:892), LSGRSDNI (SEQ ID NO:893), MIAPVAYR (SEQ ID NO:894), RPSPMWAY (SEQ ID NO:895), WATPRPMR (SEQ ID NO:896), FRLLDWQW (SEQ ID NO:897), ISSGL (SEQ ID NO:898), ISSGLLS (SEQ ID NO:899), ISSGLL (SEQ ID

NO:900), ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO:901), AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO:902), AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO:903), ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO:904), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO:905), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO:906), ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO:907), ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO:908), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO:909), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO:910), ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO:911), AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO:912), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO:913), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO:914), AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO:915), AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO:916), AVGLLAPPGGLSGRSNDP (SEQ ID NO:917), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO:918), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO:919), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO:920), AVGLLAPPGGLSGRSNDI (SEQ ID NO:921), GLSGRSNDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO:1009) и GLSGRSNDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO:1010).

[00116] Предпочтительная CM включает ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO:377).

[00117] Спейсеры и линкеры

[00118] Линкеры, подходящие для применения в композициях, описанных в настоящем документе, обычно являются такими линкерами, которые обеспечивают гибкость модифицированного АВ или активируемых антител, что облегчает ингибирование связывания АВ с мишенью. Такие линкеры обычно называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть с легкостью выбраны и могут иметь любую подходящую длину, такую как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, в том числе от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[00119] Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры, включающие, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 191) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 192), где n является целым числом, равным по меньшей мере единице, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 193), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 194), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 195), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 196), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 197), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 198) и т.п. Глициновые, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры известны в уровне техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно не структурированными и поэтому могут служить в качестве нейтрального соединения между компонентами. Глицину доступно значительно большее фи-пси пространство, чем даже аланину, при этом он гораздо меньше ограничен по сравнению с остатками, имеющими более длинные боковые цепи (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Среднему специалисту должно быть понятно, что конструкция активируемых антител может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, такими, что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые дают менее гибкую структуру с получением требуемой структуры

активируемых антител.

[00120] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из L1 или L2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO:191) и (GGGS)_n (SEQ ID NO:192), где n является целым числом, равным по меньшей мере единице.

[00121] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из L1 или L2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO:193), GGSGG (SEQ ID NO:194), GSGSG (SEQ ID NO:195), GSGGG (SEQ ID NO:196), GGGSG (SEQ ID NO:197) и GSSSG (SEQ ID NO:198).

[00122] В некоторых вариантах осуществления L1 включает аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO:199), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:200), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:201), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO:202), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:203) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO:204).

[00123] В некоторых вариантах осуществления L2 включает аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGS (SEQ ID NO:205), GSSGT (SEQ ID NO:206) или GSSG (SEQ ID NO:207).

[00124]

[00125] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид конъюгирован с активируемым антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер конъюгирован с активируемым антителом без сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления спейсер соединен непосредственно с MM активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления спейсер соединен непосредственно с MM активируемого антитела в следующей структуре, от N-конца к C-концу: спейсер-MM-СМ-АВ. Примером спейсера, соединенного непосредственно с N-концом MM активируемого антитела, является, например, QGQSGS (SEQ ID NO:923); GQSGS (SEQ ID NO:1192); QSGS (SEQ ID NO:1193); SGS (SEQ ID NO:1194); GS (SEQ ID NO:1195); S; QGQSGQG (SEQ ID NO:924); GQSGQG (SEQ ID NO:395); QSGQG (SEQ ID NO:925); SGQG (SEQ ID NO:926); GQG (SEQ ID NO:927); QG (SEQ ID NO:928); G; QGQSGQ (SEQ ID NO:1196); GQSGQ (SEQ ID NO:1197); QSGQ (SEQ ID NO:1198); SGQ (SEQ ID NO:1198); GQ (SEQ ID NO:1199); и Q.

[00126] Предпочтительный спейсер включает QGQSGS (SEQ ID NO:923).

[00127] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не включает спейсерную последовательность.

[00128] СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

[00129] В изобретении предложены способы предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, облегчения симптома или иного уменьшения тяжести опосредованного PDL1 заболевания у индивида путем введения терапевтически эффективного количества активируемого антитела против PDL1, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом индивиду. В изобретении предложено применение

активируемого антитела против PDL1, описанного в настоящем документе, при задержке прогрессирования, лечении, облегчении симптома или ином уменьшении тяжести опосредованного PDL1 заболевания у индивида путем введения терапевтически эффективного количества активируемого антитела против PDL1. Терапевтически эффективное количество описано ниже в разделе, озаглавленном Доза и введение.

[00130] PDL1, как известно, экспрессируется в различных раковых опухолях. См. например, публикацию Chen et al., "Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy - Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1", Clin. Can. Res., vol. 18: 6580-6587 (2012), содержание которой настоящим включено посредством отсылки во всей полноте.

[00131] Онкологические заболевания, подходящие для задержки прогрессирования, лечения, облегчения симптома в соответствии со способами изобретения, включают, например, без ограничения:

[00132] плоскоклеточную карциному анального канала, базальноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак костей, колоректальную карциному, рак молочной железы, карциноид, кастрационно-резистентный рак предстательной железы (КРРПЖ), карциному шейки матки, рак толстой и прямой кишки (CRC), рак толстой кишки, плоскоклеточную карциному кожи, рак эндометрия, рак пищевода, карциному желудка, рак гастроэзофагеального перехода, глиобластому/смешанную глиому, глиому, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, гемобластоз, рак печени, рак легкого, меланому, рак из клеток Меркеля, множественную миелому, рак носоглотки, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, перитонеальную карциному, недифференцированную плеоморфную саркому, рак предстательной железы, карциному прямой кишки, рак почки, саркому, карциному слюнных желез, плоскоклеточную карциному, рак желудка, рак яичка, карциному тимуса, эпителиальную опухоль тимуса, тимому, рак щитовидной железы, уrogenитальный рак, уротелиальный рак, карциному матки или саркому матки.

[00133] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак с высокой Мутационной нагрузкой опухоли (hTMB).

[00134] В других вариантах осуществления рак молочной железы является трижды негативным раком молочной железы или эстроген-рецептор-положительным раком молочной железы. Гемобластоз является лимфомой, лейкозом или множественной миеломой. Лимфома включает В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина или ВЭБ-ассоциированную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления лимфома Ходжкина является пост-алло-ТГСК.

[00135] Колоректальная карцинома является, например, карциномой тонкой кишки или аденокарциномой тонкой кишки.

[00136] Рак головы и шеи включает, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи. Рак пищевода является, например, карциномой пищевода.

[00137] Рак толстой кишки является, например, аденокарциномой толстой кишки,
[00138] Рак легкого является, например, немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) или мелкоклеточным раком легкого.

[00139] НМРЛ является неплюскоклеточным НМРЛ или плоскоклеточным НМРЛ.

[00140] Рак предстательной железы является, например, мелкоклеточным нейроэндокринным раком предстательной железы.

[00141] В некоторых вариантах осуществления рак является карциномой, такой как, например, плоскоклеточная карцинома.

[00142] В других вариантах осуществления рак представляет собой рак почки, такой как почечно-клеточную карциному или саркому почки.

[00143] Онкологические заболевания, особенно подходящие при практическом осуществлении способов и применений изобретения, включают недифференцированную плеоморфную саркому, аденокарциному тонкой кишки, карциному из клеток Меркеля, карциному тимуса, плоскоклеточную карциному анального канала, плоскоклеточную карциному кожи и трижды негативный рак молочной железы.

[00144] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка или рак гастроэзофагеального перехода.

[00145] В некоторых вариантах осуществления рак желудка или гастроэзофагеальный рак является распространенным неоперабельным раком II/III типа по классификации Зиверта в случае опухолей со значительным эзофагеальным компонентом.

[00146] В некоторых вариантах осуществления рак является тимомой или раком тимуса. Рак тимуса представляет собой эпителиальную опухоль тимуса.

[00147] В некоторых вариантах осуществления рак является меланомой. В некоторых вариантах осуществления рак является глазной меланомой.

[00148] В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома и хронический миелогенный лейкоз.

[00149] В некоторых вариантах осуществления рак обусловлен PDL1-экспрессирующей опухолью.

[00150] Рак является распространенной неоперабельной солидной опухолью или лимфомой. Распространенная неоперабельная опухоль является опухолью PDL1-чувствительного типа.

[00151] В некоторых вариантах осуществления индивид имеет неоперабельную солидную опухоль, для которой не существует другого доступного стандартного лечения. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет лимфому, для которой не существует другого доступного стандартного лечения. В некоторых вариантах осуществления индивид не подвергался иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления терапия ингибитором PDL1/PD1 не одобрена для формы рака индивида.

[00152] В некоторых вариантах осуществления статус PDL1 индивида и/или

опухоли неизвестен. В некоторых вариантах осуществления индивид и/или опухоль являются PDL1-положительными (PDL1+), например, индивид имеет оценку пропорции опухоли по меньшей мере 1% окрашивания мембран опухолевых клеток.

[00153] Активируемое антитело против PDL1, применяемое в любом из вариантов осуществления настоящих способов и применений, может быть введено на любой стадии заболевания. Например, такое активируемое антитело против PDL1 могут вводить пациенту, страдающему раком любой стадии, от раннего до метастатического. В некоторых вариантах осуществления рак включает распространенные или рецидивирующие солидные опухоли или лимфомы. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет неоперабельную солидную опухоль.

[00154] В изобретении также предложены способы лечения онкобольных с аутоиммунным заболеванием или воспалительным заболеванием путем введения терапевтически эффективного количества активируемого антитела против PDL1, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом индивиду. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием является колит, РА, панкреатит, диабет или пневмонит.

[00155] В некоторых вариантах осуществления индивид является млекопитающим, таким как человек, не относящийся к человеку примат, домашнее животное (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления индивидом является человек. В некоторых вариантах осуществления индивидом является домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления индивидом является животное под наблюдением ветеринара. Предпочтительно индивидом является человек.

[00156] В различных вариантах осуществления индивиды демонстрируют одну или более следующих характеристик: ранее не подвергался лечению ингибитором PD-1/PDL1, ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4, положительный статус мутации BRAF^{V600E}, ранее не подвергался лечению ингибитором BRAF или не подвергался иммунотерапии, PDL1-положительный, PDL1-неизвестный или ранее подвергался лечению ингибитором PD1/PDL1.

[00157] В некоторых вариантах осуществления для индивида недоступно последующее стандартное лечение.

[00158] В других вариантах осуществления индивид ранее подвергался лечению ингибитором PD-1/PDL1, и лечение ингибитором PD-1/PDL1 было прекращено по причинам, не связанным с токсическим действием.

[00159] Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где индивид не подвергался иммунотерапии.

[00160] Активируемое антитело против PDL1 и его терапевтические композиции вводят индивиду, страдающему или подверженному риску развития заболевания или нарушения, ассоциированного с нарушенной экспрессией и/или активностью PDL1. Индивида, страдающего или подверженного риску развития заболевания или нарушения,

ассоциированного с нарушенной экспрессией и/или активностью PDL1, идентифицируют при использовании любых способов, известных в уровне техники. Например, индивидов, страдающих раком или другим неопластическим состоянием, идентифицируют при использовании любого клинического и/или лабораторного исследования, такого как объективное обследование и анализ крови, мочи и/или стула для оценки состояния здоровья. Например, индивидов, страдающих воспалением и/или воспалительным заболеванием, идентифицируют при использовании любых клинических и/или лабораторных исследований, таких как объективное обследование и/или анализ биологической жидкости, например анализ крови, мочи и/или стула, для оценки состояния здоровья.

[00161] Введение активируемого антитела против PDL1 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с нарушенной экспрессией и/или активностью PDL1, считают успешным, если достигнут какой-либо из множества целевых лабораторных или клинических показателей. Например, введение активируемого антитела против PDL1 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с нарушенной экспрессией и/или активностью PDL1, считают успешным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, облегчается, уменьшается, ингибируется или не прогрессирует до следующего состояния, т.е. не ухудшается. Введение активируемого антитела против PDL1 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с нарушенной экспрессией и/или активностью PDL1, считают успешным, если заболевание или нарушение переходят в стадию ремиссии или не прогрессируют до следующего состояния, т.е. не ухудшаются.

[00162] ДОЗА И ВВЕДЕНИЕ

[00163] Противоопухолевую терапию, предложенную в настоящем документе, содержащую активируемое антитело против PDL1, применяют в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного действия. Как правило, действующие вещества вводят в количестве, которое не приводит к нежелательным побочным эффектам у пациента, проходящего лечение, или которое сводит к минимуму или уменьшает наблюдаемые побочные эффекты.

[00164] Определение точных количеств действующих веществ, включая активируемые антитела против PDL1, которые будут вводить индивиду, находится в уровне компетенции среднего специалиста в данной области. Например, такие средства и их применение для лечения солидных опухолей и лимфом известны в уровне техники. Таким образом, дозы таких средств могут быть подобраны на основе стандартных схем применения для такого средства при данном пути введения.

[00165] Следует понимать, что точная доза и продолжительность лечения зависят от подвергаемой лечению ткани или опухоли и могут быть определены эмпирически при использовании известных протоколов исследования или путем экстраполяции на основе данных, полученных в исследованиях *in vivo* или *in vitro*, и/или могут быть определены на основе известных схем применения конкретного средства. Необходимо отметить, что

значения концентрации и доз также могут быть изменены в зависимости от возраста проходящего лечение пациента, веса пациента, пути введения и/или степени или тяжести заболевания, а также других факторов, которые должен учитывать квалифицированный медицинский работник. Как правило, схемы применения и дозы подбирают так, чтобы ограничить токсическое действие. Следует отметить, что лечащий врач будет знать, как и когда закончить, прервать или скорректировать терапию, чтобы снизить дозу из-за токсического действия или нарушения функций костного мозга, печени или почек, или других тканей. С другой стороны, лечащий врач также будет знать, как и когда скорректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не достаточен (предотвращая токсические побочные эффекты). Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного индивида конкретные схемы применения и дозы нужно корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным решением лица, осуществляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны концентраций, представленные в настоящем документе, являются лишь примерными и не предназначены для ограничения их объема.

[00166] Например, активируемые антитела против PDL1 вводят в терапевтически эффективном количестве для уменьшения объема опухоли.

[00167] Количество активируемого антитела против PDL1, которое вводят для лечения заболевания или состояния, может быть определено с помощью стандартных клинических методов. Кроме того, анализы *in vitro* и модели на животных могут использоваться при определении оптимальных диапазонов доз. Точная доза, которая может быть определена эмпирически, может зависеть от пути введения, типа заболевания, подлежащего лечению, и серьезности заболевания.

[00168] Активируемые антитела против PDL1, предложенные в настоящем документе, вводят внутривенно. Для внутривенного введения конъюгат могут вводить струйно или болюсно, путем инфузии или комбинации перечисленного. Время инфузии может составлять от приблизительно 1 минуты до трех часов, например, от приблизительно 1 минуты до приблизительно двух часов или от приблизительно 1 минуты до приблизительно 60 минут, или по меньшей мере 10 минут, 40 минут или 60 минут.

[00169] Величина дозы составляет от 0,03 мг/кг до 30 мг/кг. В других вариантах осуществления величина дозы составляет от 0,3 мг/кг до 30 мг/кг. В других вариантах осуществления величина дозы составляет от 3 мг/кг до 30 мг/кг; от 3 мг/кг до 20 мг/кг; от 3 мг/кг до 15 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления величина дозы составляет от 5 мг/кг до 30 мг/кг; от 5 мг/кг до 30 мг/кг; от 5 мг/кг до 20 мг/кг; от 5 мг/кг до 15 мг/кг; или от 5 мг/кг до 10 мг/кг. В других вариантах осуществления величина дозы составляет от 10 мг/кг до 30 мг/кг; от 10 мг/кг до 20 мг/кг; или от 10 мг/кг до 15 мг/кг.

[00170] Например, величина дозы составляет 0,03 мг/кг, 0,10 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 10,0 мг/кг или 30,0 мг/кг. Величина дозы составляет 1 мг/кг, 3 мг/кг, 6

мг/кг или 15,0 мг/кг. Предпочтительно величина дозы составляет 10 мг/кг.

[00171] Активируемые антитела против PDL1, предложенные в настоящем документе, вводят в фиксированной дозе. Фиксированная дозировка рассчитана, например, на человека весом 65 кг, на человека весом 70 кг, на человека весом 75 кг или на человека весом 80 кг и дозах в мг/кг, описанных в настоящем документе. Например, когда фиксированная доза рассчитана на человека весом 80 кг, и требуемые дозы в мг/кг составляют 10 мг/кг, то тогда фиксированная доза составляет 800 мг.

[00172] Фиксированная дозировка составляет от 240 мг до 2400 мг. Примерные фиксированные дозировки включают 240 мг, 480 мг, 800 мг, 1200 мг и 2400 мг.

[00173] Частоту, время введения и величину дозы могут периодически назначать в течение курса применения для поддержания постоянного и/или долгосрочного эффекта действующих веществ в течение требуемого периода времени. Предложенные композиции активируемых антител против PDL1 могут вводить каждый час, ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежегодно или однократно. Длительность курса применения может быть определена эмпирически и зависит от заболевания, подлежащего лечению, тяжести заболевания, конкретного пациента и других факторов в рамках компетенции лечащего врача. Длительность лечения с применением комбинированной терапии, предложенной в настоящем документе, может составлять одну неделю, две недели, один месяц, несколько месяцев, один год, несколько лет или больше.

[00174] Частота введения активируемых антител против PDL1 составляет от одного раза в день до одного раза в 28 дней; от одного раза в день до одного раза в месяц, от одного раза в неделю до одного раза в месяц; от одного раза в неделю до одного раза в два месяца.

[00175] Например, частота введения активируемых антител против PDL1 составляет один раз в день, раз в два дня, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель. Другими словами, частота введения активируемых антител против PDL1 составляет один раз в день, раз в два дня, два раза в неделю, один раз в 7 дней, один раз в 14 дней, один раз в 21 день, один раз в 28 дней, в 35 дней, один раз в 42 дня, один раз в 49 дней, один раз в 56 дней. Дозы могут быть разделены на множество курсов введения в течение всего периода лечения. Например, активируемые антитела против PDL1 можно вводить с указанной частотой в течение периода длительностью приблизительно месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, год или более. Частота введения может быть одинаковой на протяжении всего курса или может отличаться. Например, примерная частота введения составляет два раза в неделю, по меньшей мере, в течение первой недели курса введения. После первой недели частота может сохраняться на уровне два раза в неделю, может быть увеличена до более двух раз в неделю или может быть уменьшена до не более чем одного раза в неделю. Специалист в данной области сумеет определить частоту и курс введения конкретной дозы на основе конкретной вводимой дозы, заболевания или состояния,

подвергаемого лечению, тяжести заболевания или состояния, возраста индивида и других аналогичных факторов.

[00176] Если симптомы заболевания сохраняются в отсутствие лечения, лечение может быть продолжено в течение дополнительного периода времени. В течение курса лечения могут контролировать проявление заболевания и/или связанного с лечением токсического действия или побочных эффектов.

[00177] Курс применения активируемых антител против PDL1 может быть подобран так, чтобы включить периоды приостановки лечения, чтобы обеспечить период восстановления после воздействия средств. Период приостановки лечения может продолжаться в течение заданного времени или может быть определен эмпирически в зависимости от ответа пациента на лечение или в зависимости от наблюдаемых побочных эффектов. Например, лечение может быть приостановлено на одну неделю, две недели, три недели, один месяц или несколько месяцев. Обычно период приостановки лечения включен в курс схемы применения для пациента.

[00178] Примером схемы применения является курс лечения или курс применения в течение 14 дней. Активируемые антитела против PDL1, раскрытые в настоящем документе, вводят в день 1 с последующим перерывом на 13 дней без введения доз. Определение точного курса применения и схемы введения находится в рамках компетенции специалиста в данной области.

[00179] Как отмечено выше, курс применения может продолжаться в течение любого требуемого периода времени. Следовательно, 14-дневный курс применения может быть повторен в течение любого периода времени. Подбор курса применения и схемы введения, которые соответствуют потребностям пациента в зависимости от индивидуальных факторов, характерных для пациента и заболевания, подлежащего лечению, находится в рамках компетенции лечащего врача.

[00180] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела против PDL1, описанные в настоящем документе, применяются в качестве единственных действующих веществ, т.е. в качестве монотерапии. В альтернативе активируемые антитела против PDL1, описанные в настоящем документе, применяются в сочетании с одним или более дополнительными средствами или комбинацией дополнительных средств, т.е. комбинированной терапией или сочетанной терапией. Подходящие дополнительные средства включают современные фармацевтические и/или хирургические терапии для применения по назначению, например, для лечения рака. Например, активируемые антитела против PDL1 могут применяться в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим противоопухолевым средством или радиацией.

[00181] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят до и/или во время, и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными средствами (например, комбинированной терапией)

[00182] Неограничивающие примеры дополнительных средств включают химиотерапевтическое средство, радиацию, ингибитор контрольной точки, ингибитор

киназы, противовоспалительное средство, иммунодепрессант, агонист Т-клеток, агонист НК-клеток, средство, направленное против ингибиторов в микроокружении опухоли, вызывающих истощение Т-клеток, антиангиогенное средство, средство, направленное против ингибиторов в микроокружении опухоли, ингибитор протеасомы, антиметаболит, антимикротубулиновое средство, ингибитор топоизомеразы, вакцину, онковирус, ДК-активирующее средство, цитотоксический антибиотик и/или любое другое средство, вызывающее повреждение нуклеиновых кислот.

[00183] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) является антителом, направленно действующим на опухоль, разработанным для уничтожения опухоли путем ADCC или посредством прямого конъюгирования с токсином (например, конъюгата антитела-лекарственного средства (ADC)). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) стимулирует костимулирующие молекулы. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(а) представляет собой адаптивное Т-клеточное терапевтическое средство, которое влияет на адаптивный перенос Т-клеток.

[00184] В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует аденозин A2aR. В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует аргиназу. В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует CD39. В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует CD73. В некоторых вариантах осуществления средство ингибирует CD47.

[00185] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является химиотерапевтическим средством. Химиотерапевтические средства включают, например, алкилирующие средства, таксаны. Алкилирующие средства включают, например, химиотерапию на основе платины, такую как карбоплатин или цисплатин, оксалиплатин.

[00186] Таксаны включают, например, доцетаксел, паклитаксел, Абраксан® (т.е. конъюгированный с альбумином паклитаксел). Другие химиотерапевтические средства включают доксорубицин, иринотекан, гемцитабин и любые химиотерапевтические средства, известные специалистам в данной области.

[00187] Ингибитор микроокружения опухоли включает, например, ингибитор ИДО, ингибитор α -CSF1R, ингибитор α -CCR4, блокатор TGF-бета, миелоидную супрессорную клетку или регуляторную Т-клетку.

[00188] В некоторых вариантах осуществления агонист выбран из группы, состоящей из Oх40, GITR, CD137, ICOS, CD27 и HVEM.

[00189] В некоторых вариантах осуществления ДК-активирующее средство включает, в качестве неограничивающего примера, агонист toll-подобных рецепторов (TLR) и/или α -CD40.

[00190] Ингибитор контрольной точки ингибирует (например, блокирует) белки иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки включают, например, CTLA-4, LAG-3, PD1 (также называемый PD-1), PDL1, TIGIT, TIM-3, B7H4 и Vista.

[00191] Ингибиторы киназ ингибируют киназы, такие как B-RAFi, MEKi и Btk.

[00192] Примеры ингибиторов киназ включают пазопаниб, осимертиниб, кризотиниб, сорафениб или эрлотиниб.

[00193] Ингибитор B-RAF_i включает, например, вемурафениб. Ингибитор Vtk включает, например, ибрутиниб. Ингибиторы MEK_i киназы включают, например, траметиниб, кобиметиниб или селуметиниб.

[00194] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является иммуномодулирующим средством, таким как леналидомид или IL-2.

[00195] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является ингибитором протеасомы, таким как бортезомиб или карфилзомиб.

[00196] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является средством, которое специалисты в данной области считают стандартом лечения.

[00197] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является средством направленного действия, таким как другое антитело, например, моноклональное антитело (например, ипилимумаб или бевацизумаб), биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело.

[00198] Дополнительные средства вводят одновременно или в разное время в течение схемы лечения. Например, активируемое антитело против PDL1 вводят одновременно с дополнительным средством, до введения дополнительного средства или после введения дополнительного средства, или путем чередования указанных схем. Дополнительное средство вводят в однократной дозе или в многократной дозе.

[00199] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является средством направленного действия, таким как другое антитело, например, моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является ингибитором протеасомы, таким как бортезомиб или карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является иммуномодулирующим средством, таким как леналидомид или IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является радиацией. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является средством, которое специалисты в данной области считают стандартом лечения. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является химиотерапевтическим средством, известным специалистам в данной области.

[00200] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, другим конъюгированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, другим активируемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и/или другим конъюгированным активируемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, другим конъюгированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, другим активируемым антителом или его

антигенсвязывающим фрагментом и/или другим конъюгированным активируемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом против той же мишени, что и первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, первое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, против PDL1. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, другим конъюгированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, другим активируемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и/или другим конъюгированным активируемым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом против мишени, отличающейся от мишени первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, первого конъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или конъюгированного активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (т.е. другой мишени кроме PDL1). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является мультиспецифичным антителом, таким как биспецифичное антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является мультиспецифичным активируемым антителом, таким как биспецифичное активируемое антитело.

[00201] В некоторых вариантах осуществления дополнительным средством является ипилимумаб, CTLA4-связывающий фрагмент ипилимумаба и/или активируемое антитело на основе ипилимумаба.

CD51	CYR61	hGH
------	-------	-----

[00202] В качестве неограничивающего примера дополнительное средство представляет собой антитело или получено на основе антитела, перечисленного в Таблице 23.

Таблица 22: Примерные источники дополнительных средств

Торговое название антитела (название антитела)	Мишень
Авастин TM (бевацизумаб)	VEGF
Луцентис TM (ранибизумаб)	VEGF
Эрбитукс TM (цетуксимаб)	EGFR
Вектибикс TM (панитумумаб)	EGFR
Ремикейд TM (инфликсимаб)	TNF α
Хумира TM (адалимумаб)	TNF α
Тизабри TM (натализумаб)	Интегрин $\alpha 4$
Симулект TM (базиликсимаб)	IL2R
Солирис TM (экулизумаб)	Комплемент C5
Раптива TM (эфализумаб)	CD11a
Бексар TM (тозитумомаб)	CD20
Зевалин TM (ибритумомаб тиуксетан)	CD20

Ритуксан TM (ритуксимаб)	CD20
(Окрелизумаб)	CD20
Арзерра TM (офатумумаб)	CD20
Газива TM (обинутузумаб)	CD20
Зенапакс TM (даклизумаб)	CD25
Адцетрис TM (брентуксимаб ведотин)	CD30
Миелотарг TM (гемтузумаб)	CD33
Милотарг TM (гемтузумаб озогамицин)	CD33
Кэмпас TM (алемтузумаб)	CD52
РеоПро TM (абциксимаб)	Гликопротеиновый рецептор IIb/IIIa
Ксолар TM (омализумаб)	IgE
Герцептин TM (трастузумаб)	Her2
Кадсила TM (трастузумаб эмтанзин)	Her2
Синагис TM (павивизумаб)	F-белок РСВ
(ипилимумаб)	CTLA-4
(тремелимумаб)	CTLA-4
Нu5c8	CD40L
(пертузумаб)	Her2-neu
(эртумаксумаб)	CD3/Her2-neu
Оренсия TM (абатацепт)	CTLA-4
(танезумаб)	NGF
(бавитуксимаб)	Фосфатидилсерин
(залутумумаб)	EGFR
(мапатумумаб)	EGFR
(матузумаб)	EGFR
(нимотузумаб)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(эдреколомаб)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Энбрел TM (этанерцепт)	TNF-R
Амевив TM (алефацепт)	1-92-LFA-3
Антрил TM , Кинерет TM (анакинра)	IL-1Ra
GC1008	TGF-бета
	Notch, например, Notch 1
	Jagged 1 или Jagged 2
(адекатумумаб)	EpCAM
(фигитумумаб)	IGF1R

(тоцилизумаб)	Рецептор IL-6
Стелара™ (устекинумаб)	IL-12/IL-23
Пролиа™ (деносумаб)	RANKL
Опдиво® (ниволумаб)	PD1
Китруда® (пембролизумаб)	PD1
пидилизумаб	PD1
MEDI0680	PD1
PDR001	PD1
REGN2810	PD1
BGB-A317	PD1
BI-754091	PD1
JNJ-63723283	PD1
MGA012	PD1
TSR042	PD1
AGEN2034	PD1
INCSHR-1210	PD1
JS001	PD1
Имфинзи™ (дурвалумаб)	PD-L1
Тецентрик® (атезолизумаб)	PD-L1
Бавенсио® (авелумаб)	PD-L1
FAZ053	PD-L1
LY-3300054	PD-L1
KN035	PD-L1

[00203] Дополнительные средства вводят одновременно или в разное время в течение схемы лечения. Например, активируемое антитело против PDL1 вводят одновременно с дополнительным средством, до введения дополнительного средства или после введения дополнительного средства, или путем чередования указанных схем. Дополнительное средство вводят в однократной дозе или в многократной дозе.

[00204] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 согласно изобретению применяется в комбинации с ингибитором CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 согласно изобретению применяется в комбинации с антителом против CTLA-4, таким как, например, ипилимумаб.

[00205] Ингибитор CTLA-4, такой как ипилимумаб, вводят в дозе от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг, от 3 мг/кг до 10 мг/кг. Например, ингибитор CTLA-4, такой как ипилимумаб, вводят в дозе 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг.

[00206] В различных вариантах осуществления антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в фиксированной дозе, фиксированная дозировка рассчитана, например, на человека весом 65 кг, человека весом 70 кг, человека весом 75 кг или человека весом 80 кг и дозы в мг/кг, описанные в настоящем документе. Например, когда

фиксированная доза рассчитана на человека весом 80 кг, и требуемая доза в мг/кг составляет 10 мг/кг, то тогда фиксированная доза составляет 800 мг. При необходимости доза в мг/кг составляет 6 мг/кг, тогда фиксированная доза составляет 480 мг. При необходимости доза в мг/кг составляет 3 мг/кг, тогда фиксированная доза составляет 240 мг. Фиксированная дозировка антитела против CTLA-4, например ипилимумаба, составляет от 140 мг до 1000 мг. Примерные фиксированные дозировки включают 240 мг, 480 мг и 800 мг.

[00207] В некоторых вариантах осуществления ипилимумаб вводят в более высокой дозе, чем его максимальная переносимая доза для данного показания. В альтернативе ипилимумаб вводят в более низкой дозе, чем его максимальная переносимая доза для данного показания.

[00208] В других вариантах осуществления ипилимумаб вводят в более высокой дозе, чем его рекомендуемая доза для данного показания. В альтернативе ипилимумаб вводят в более низкой дозе, чем рекомендуемая доза для данного показания.

[00209] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят внутривенно (в/в).

[00210] Частота введения антитела против CTLA-4, например ипилимумаба, составляет от одного раза в день до одного раза в 28 дней; от одного раза в день до одного раза в месяц, от одного раза в неделю до одного раза в месяц; от одного раза в неделю до одного раза в два месяца. Например, частота введения антитела против CTLA-4, например ипилимумаб, составляет один раз в день, один раз в два дня, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель. Другими словами, частота введения активируемого антитела против CTLA-4, например ипилимумаба, составляет один раз в день, один раз в два дня, два раза в неделю, один раз в 7 дней, один раз в 14 дней, один раз в 21 день, один раз в 28 дней, один раз в 35 дней, один раз в 42 дня, один раз в 49 дней, один раз в 56 дней.

[00211] Активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в с регулярным интервалом. Активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в с одинаковым регулярным интервалом. В альтернативе активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в с разными регулярными интервалами.

[00212] В некоторых вариантах осуществления частота введения активируемых антител против PDL1 составляет от одного раза в день до одного раза в 28 дней; от одного раза в день до одного раза в месяц, от одного раза в неделю до одного раза в месяц; от одного раза в неделю до одного раза в два месяца, и частота введения антитела против CTLA-4, например ипилимумаба, составляет один раз в 7 дней, один раз в 14 дней или

один раз в 28 дней.

[00213] Например, частота введения активируемых антител против PDL1 составляет один раз в день, один раз в два дня, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель, частота введения антитела против CTLA-4, например ипилимумаба, составляет один раз в 7 дней, один раз в 14 дней или один раз в 28 дней.

[00214] В альтернативе частота введения активируемых антител против PDL1 составляет один раз в день, один раз в два дня, два раза в неделю, один раз в 7 дней, один раз в 14 дней, один раз в 21 день, один раз в 28 дней, один раз в 35 дней, один раз в 42 дня, один раз в 49 дней, один раз в 56 дней. Частота введения антитела против CTLA-4, например ипилимумаба, составляет один раз в 7 дней, один раз в 14 дней или один раз в 28 дней.

[00215] Например, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в один раз в 21 день в многократных дозах.

[00216] Например, в некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в один раз в 14 дней в многократных дозах.

[00217]

[00218] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1, ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в один раз в 21 день по меньшей мере в двух или более дозах, например, по меньшей мере четырех или более дозах. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в один раз в 21 день в четырех дозах.

[00219] В некоторых вариантах осуществления антитело против PDL1, конъюгированное антитело против PDL1, активируемое антитело против PDL1 и/или конъюгированное активируемое антитело против PDL1 согласно изобретению и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в один раз в 21 день по меньшей мере в двух или больше дозах, например, по меньшей мере четырех дозах, с последующим введением активируемого антитела против PDL1 в качестве монотерапии в течение требуемого периода времени

[00220] В некоторых вариантах осуществления антитело против PDL1, конъюгированное антитело против PDL1, активируемое антитело против PDL1 и/или конъюгированное активируемое антитело против PDL1 согласно изобретению вводят в/в в дозе 0,3 мг/кг, 1,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг, и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят в/в в дозе 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в в дозе 10,0 мг/кг, 6 мг/кг или 10 мг/кг или в дозе 6 мг/кг или 10 мг/кг. В некоторых вариантах

осуществления активируемое антитело против PDL1 и ингибитор CTLA-4, например, антитело против CTLA-4, например ипилимумаб, вводят согласно схеме применения и/или введения доз, показанной на ФИГ. 1, Части В1 или Части В2, и описанной в Примере 2. В любом из этих вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, используется активируемое антитело против PDL1 согласно изобретению. В примере осуществления активируемым антителом против PDL1 является PL07-2001-C5H9v2.

[00221] Например, многократные дозы активируемого антитела и антитела против CTLA-4 вводят в течение первого периода времени с последующим введением многократных доз активируемого антитела против PDL1 в качестве монотерапии в течение второго периода времени.

[00222] Например, дозу активируемого антитела и дозу антитела против CTLA-4 вводят параллельно в качестве комбинированной терапии, один раз в 21 день в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела против PDL1 в качестве монотерапии один раз в 14 дней.

[00223] В некоторых вариантах осуществления многократные дозы активируемого антитела против PDL1 в качестве монотерапии вводят в течение первого периода времени, с последующим параллельным введением многократных доз активируемого антитела против PDL1 и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени.

[00224] Например, многократные дозы активируемого антитела вводят в качестве монотерапии в течение первого периода времени, а затем многократные дозы активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии вводят в течение второго периода времени, с последующим введением многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение третьего периода времени.

[00225] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело вводят в качестве монотерапии один раз в 14 дней в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела и дозы антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии один раз в 21 день, в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии один раз в 14 дней.

[00226] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 применяется в комбинации с ингибитором B-RAF. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 согласно изобретению применяется в комбинации с вемурафенибом.

[00227] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят внутривенно (в/в), а ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят внутрь (п/о). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в, а многократные дозы, например две или более доз, ингибитора B-RAF, например, вемурафениба, вводят п/о ежедневно. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в, и две дозы ингибитора B-RAF, например

вемурафениба, вводят ежедневно п/о. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в один раз в 14 дней, а две дозы ингибитора B-RAF, например вемурафениба, вводят ежедневно п/о.

[00228] В некоторых вариантах осуществления ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 960 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят два раза в день п/о в дозе 960 мг.

[00229] В некоторых вариантах осуществления ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 875 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят два раза в день п/о в дозе 875 мг.

[00230] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в в дозе 1,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг, а ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 960 мг. В других вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в в дозе 1,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 10,0 мг/кг и 30,0 мг/кг, а ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 875 мг.

[00231] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в в дозе 10,0 мг/кг, а ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 960 мг.

[00232] В других вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 вводят в/в в дозе 10,0 мг/кг, а ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 875 мг.

[00233] Доза другого против PDL1, вводимого в/в в дозе 10,0 мг/кг, и ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят п/о в дозе 875 мг.

[00234] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против PDL1 и ингибитор B-RAF, например вемурафениб, вводят согласно схеме применения и/или введения доз, показанной на ФИГ. 1, Части С, и описанной в Примере 1.

[00235] **Конъюгаты активируемого антитела против PDL1-лекарственного средства**

[00236] Композиции и способы, предложенные в настоящей заявке, обеспечивают присоединение одного или более средств к одному или более остаткам цистеина в АВ без нарушения активности (например, маскирующей, активирующей или связывающей активности) активируемого антитела против PD-1. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, предложенные в настоящей заявке, обеспечивают присоединение одного или более средств к одному или более остаткам цистеина в АВ без уменьшения или какого-либо иного нарушения одной или более дисульфидных связей в ММ. Композиции и способы, предложенные в настоящей заявке, обеспечивают получение активируемого антитела против PD-1, которое конъюгировано с одним или более средствами, например любыми терапевтическими, диагностическими и/или профилактическими средствами, например, в некоторых вариантах осуществления, без конъюгирования какого-либо средства (средств) с ММ активируемого антитела против PD-1. Композиции и способы, предложенные в настоящей заявке, обеспечивают

получение конъюгированных активируемых антител против PD-1, в которых MM сохраняет способность эффективно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Композиции и способы, предложенные в настоящей заявке, обеспечивают получение конъюгированных активируемых антител против PD-1, в которых активируемое антитело сохраняет способность активироваться, т.е. расщепляться, в присутствии протеазы, которая может расщеплять SM.

[00237] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, описанные в настоящей заявке, также включают средство, конъюгированное с активируемым антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное средство является терапевтическим средством, таким как противовоспалительное и/или противоопухолевое средство. В таких вариантах осуществления средство конъюгировано с углеводной группой активируемого антитела, например, в некоторых вариантах осуществления, когда углеводная группа расположена за пределами антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе.

[00238] В некоторых вариантах осуществления средство является цитотоксическим средством, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

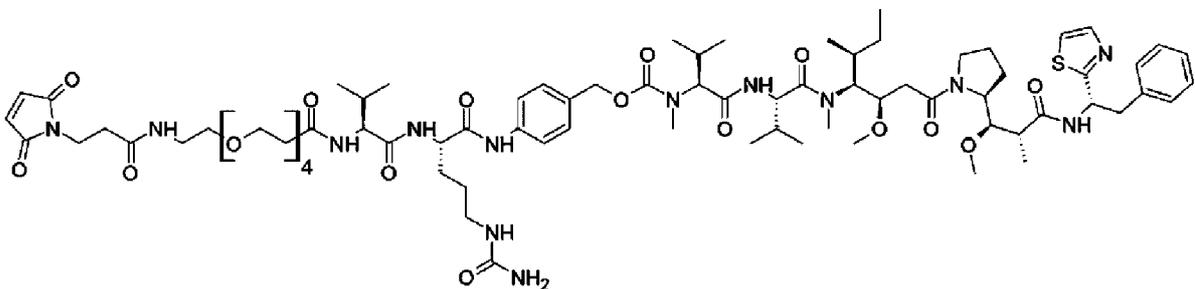
[00239] В некоторых вариантах осуществления средство является детектируемой частью, такой как, например, метка или другой маркер. Например, средство является или включает меченую радиоактивным изотопом аминокислоту, одну или более биотинильных групп, которые можно детектировать с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена с помощью оптических или калориметрических методов), один или более радиоизотопов или радионуклидов, одну или более флуоресцентных меток, одну или более ферментных меток и/или одно или более хемилюминесцентных веществ. В некоторых вариантах осуществления детектируемые молекулы присоединены с помощью спейсерных молекул.

[00240] В изобретении также предложены иммуноконъюгаты, содержащих антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат). Подходящие цитотоксические средства включают, например, доластатины и их производные (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Например, средство является монометилауристатином E (MMAE) или монометилауристатином D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления средство является средством, выбранным из группы, перечисленной в Таблице 11. В некоторых вариантах осуществления средством является доластатин. В некоторых вариантах

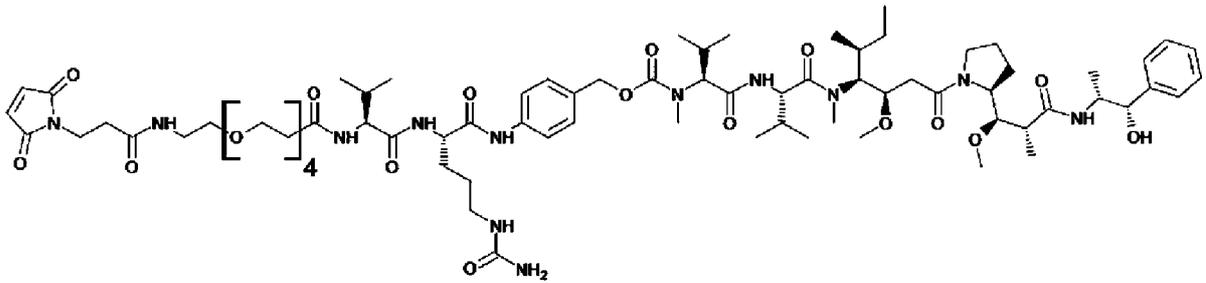
осуществления средством является ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средством является ауристин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средством является монометилауристин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средством является монометилауристин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления средством является мейтанзиноид или производное мейтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средством является DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средством является дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средством является калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средством является пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средством является димер пирролобензодиазепина.

[00241] В некоторых вариантах осуществления средство соединено с АВ при использовании малеимидного капроил-валин-цитруллинового линкера или малеимидного ПЭГ-валин-цитруллинового линкера. В некоторых вариантах осуществления это средство соединено с АВ при использовании малеимидного капроил-валин-цитруллинового линкера. В некоторых вариантах осуществления средство соединено с АВ при использовании малеимидного ПЭГ-валин-цитруллинового линкера. В некоторых вариантах осуществления средством является монометилауристин D (ММАД), соединенный с АВ при использовании малеимидного ПЭГ-валин-цитруллин-параминобензилоксикарбонильного линкера, при этом такая конструкция линкера-полезной нагрузки именуется в настоящем документе как "vc-ММАД". В некоторых вариантах осуществления средством является монометилауристин Е (ММАЕ), соединенный с АВ при использовании малеимидного ПЭГ-валин-цитруллин-параминобензилоксикарбонильного линкера, при этом такая конструкция линкера-полезной нагрузки именуется в настоящем документе как "vc-ММАЕ". Структуры vc-ММАД и vc-ММАЕ показаны ниже:

vc-ММАД:



vc-ММАЕ:



[00242] В изобретении также предложены конъюгированные активируемые антитела, которые включают активируемое антитело, связанное с монометил ауристатином D (MMAD) в качестве полезной нагрузки, где активируемое антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфично связывается с мишенью, маскирующую часть (MM), которая ингибирует связывание AB активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемую часть (CM), соединенную с AB, и CM представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат по меньшей мере для одной MMP протеазы.

[00243] В некоторых вариантах осуществления MMAD-конъюгированное активируемое антитело может быть конъюгировано при использовании любого из нескольких способов присоединения средств к AB: (a) присоединение к углеводным группам AB, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам AB, или (c) присоединение к аминогруппам AB, или (d) присоединение к карбоксилатным группам AB.

[00244] В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликолевый (ПЭГ) компонент линкера настоящего изобретения сформирован из 2 этиленгликолевых мономеров, 3 этиленгликолевых мономеров, 4 этиленгликолевых мономеров, 5 этиленгликолевых мономеров, 6 этиленгликолевых мономеров, 7 этиленгликолевых мономеров, 8 этиленгликолевых мономеров, 9 этиленгликолевых мономеров или по меньшей мере 10 этиленгликолевых мономеров. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ компонент представляет собой разветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ компонент представляет собой неразветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ полимерный компонент функционализирован аминогруппой или ее производным, карбоксильной группой или ее производным, или и аминогруппой или ее производным, и карбоксильной группой или ее производным.

[00245] В некоторых вариантах осуществления ПЭГ компонент линкера настоящего изобретения является амино-тетра-этиленгликоль-карбоксильной группой или ее производным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ компонент линкера настоящего изобретения является амино-три-этиленгликоль-карбоксильной группой или ее производным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ компонент линкера настоящего изобретения является амино-ди-этиленгликоль-карбоксильной группой или ее производным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислота является образованием амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой, с которой

она конъюгирована. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное является образованием амидной связи между карбоксильной группой и аминогруппой, с которой она конъюгирована. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное является образованием сложноэфирной связи между карбоксильной группой и гидроксильной группой, с которой она конъюгирована.

[00246] Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут использоваться, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Множество радионуклидов доступно для получения радиоко́нъюгированных антител. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re . В некоторых вариантах осуществления изотопом является цирконий.

[00247] Средним специалистам в данной области будет понятно, что большое количество возможных фрагментов может быть присоединено к полученным активируемым антителам согласно изобретению (см., например, публикацию "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки).

[00248] **Фармацевтические композиции**

[00249] Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела согласно настоящему описанию (также именуемые в настоящей заявке как "активные соединения"), а также их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, включают антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании в настоящем документе предполагается, что термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и вещества, задерживающие абсорбцию, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем выпуске Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартного справочного текста в данной области, который включен в настоящий документ посредством отсылки. Подходящие примеры таких носителей или разбавителей включают, без ограничения перечисленными, воду, раствор хлорида натрия, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также могут использоваться липосомы и неводные растворители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных

веществ известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда стандартные среды или средство несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в композициях. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции.

[00250] Фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию имеет такой состав, который соответствует ее предполагаемому пути введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляцию), чрескожное (т.е. наружное), чресслизистое и ректальное введение. Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; противобактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновую кислоту или бисульфит натрия; хелатообразующие вещества, такие как этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и вещества для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстрозу. Показатель pH можно регулировать кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального применения может быть заключен в ампулы, шприцы для однократного применения или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластмассы.

[00251] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (при растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы присутствовала возможность легкого применения с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть предохранена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, при помощи покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и при помощи поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. В некоторых вариантах осуществления потребуется включение изотонических средств, например сахаров,

полиспиртов, таких как маннит, сорбит, хлорид натрия, в композиции. Пролонгированная абсорбция композиций для инъекций может быть получена при включении в композицию вещества, которое задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00252] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения действующего соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией компонентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии изготавливают путем включения действующего соединения в стерильный растворитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые компоненты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы изготовления включают вакуумную сушку и лиофильную сушку, которые позволяют получить порошок действующего вещества плюс любой дополнительный требуемый компонент из его предварительно простерилизованного фильтрованием раствора.

[00253] Композиции для перорального применения обычно включают инертный разбавитель или носитель для приема внутрь. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для перорального введения терапевтического средства действующее соединение может быть включено в состав с вспомогательными веществами и может применяться в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального применения также могут быть изготовлены при использовании текучего носителя для применения в качестве средства для полоскания рта, в котором соединение в текучем носителе применяют в полости рта и полощут и сплевывают или глотают. Фармацевтически совместимые связующие вещества и/или вспомогательные материалы могут быть включены в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих компонентов или соединений аналогичного характера: связующее вещество, такое как микрокристаллическую целлюлозу, трагакант или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактозу, разрыхлитель, такой как альгиновую кислоту, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахарозу или сахарин; или ароматизатор, такой как мяту, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[00254] Для ингаляционного применения соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из контейнера под давлением или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как углекислый газ, или небулайзера.

[00255] Системное введение также может быть проведено чресслизистым или чрескожным путями. В случае чресслизистого или чрескожного введения, в композиции используют способствующие проникновению вещества, которые соответствуют барьеру, через который требуется проникнуть. Такие способствующие проникновению вещества широко известны в уровне техники и включают, например для чресслизистого введения,

детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Чресслизистое введение может быть выполнено с помощью назальных спреев или суппозиториев. В случае чрескожного введения действующие соединения включают в состав мазей, бальзамов, гелей или кремов, как известно в уровне техники.

[00256] Соединения также могут быть изготовлены в форме суппозиториев (например, со стандартными суппозиторными основами, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживаемых микроклизм для ректальной доставки.

[00257] В одном варианте осуществления действующие соединения приготавливают с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, например, в виде композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут применяться биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочная кислота. Способы изготовления таких композиций будут очевидны специалистам. Материалы также могут быть получены коммерчески из Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включающие липосомы, направленно взаимодействующие с инфицированными клетками посредством моноклональных антител к вирусным антигенам) также могут применяться в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть изготовлены согласно способам, известным специалистам в данной области, например, как описано в патенте США 4,522,811.

[00258] Наиболее предпочтительно изготавливать композиции для перорального или парентерального применения в стандартной лекарственной форме для удобства введения и единообразия дозирования. Стандартная лекарственная форма при использовании в настоящей заявке относится к физически дискретным единицам, которым подходят в качестве однократных доз для индивида, подлежащего лечению; каждая единица содержит заданное количество действующего соединения, вычисленное так, чтобы оно оказывало требуемое терапевтическое воздействие, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования для стандартных лекарственных форм согласно настоящему описанию продиктованы и непосредственно зависят от уникальных особенностей действующего соединения, а также конкретного терапевтического эффекта, который требуется достичь, и ограничений, характерных в области изготовления композиций такого действующего соединения для лечения пациентов.

[00259] Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

[00260] Если не определено иное, научные и технические термины, используемые в настоящем описании, должны иметь значения, под которыми их обычно понимают специалисты в данной области техники. Термин "а" объект или "an" объект относится к

одному или более таким объектам. Например, соединение относится к одному или более соединениям. Таким образом, термины "a", "an", "один или более" и "по меньшей мере один" могут использоваться попеременно. Кроме того, если из контекста не следует иное, термины в единственном числе включают множества, а множественные термины включают единственное число. Как правило, номенклатура, используемая в отношении, и технологии, культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, а также химии белков и олиго- или полинуклеотидов и гибридизации, описанные в настоящей заявке, хорошо известны и широко используются в данной области. Стандартные методы используются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования тканей, а также трансформации (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методики очистки проводят в соответствии с инструкциями производителя или как обычно проводят в данной области, или как описано в настоящей заявке. Вышеуказанные способы и методики обычно проводят в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в уровне техники и описанными в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в тексте настоящего описания. См., Например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатура, используемая в отношении, и лабораторные процедуры и методики, аналитической химии, химии органического синтеза, а также фармакологической и фармацевтической химии хорошо известна и широко используется в данной области. Стандартные методики используются для химического синтеза, химического анализа, изготовления лекарственных препаратов, композиций и доставки лекарственных средств, а также для лечения пациентов.

[00261] Следует понимать, что при использовании в соответствии с настоящим описанием, следующие термины, если не указано иное, должны иметь следующие значения:

[00262] При использовании в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов (Ig), т.е. молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, который специфично связывает антиген (иммунореагирует с антигеном). Под "специфично связывает" или "иммунореагирует с", или "иммуноспецифично связывает" понимается, что антитело реагирует с одной или более антигенными детерминантами требуемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с намного более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают, без ограничения перечисленными, поликлональное, моноклональное, химерное, доменное антитело, одноцепочечное, Fab и F(ab')₂-фрагменты, scFv и Fab экспрессионную библиотеку.

[00263] Основная структурная единица антитела, как известно, включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает переменную

область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственных за распознавание антигена. С-концевая часть каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Как правило, молекулы антитела, полученные у людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга свойствами тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также имеют субклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Кроме того, у людей легкая цепь может быть каппа цепью или лямбда цепью.

[00264] Термин "моноклональное антитело" (МАТ) или "композиция моноклонального антитела" при использовании в настоящем описании относится к совокупности молекул антитела, которые содержат только один молекулярный тип молекулы антитела, состоящей из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR-области) моноклонального антитела идентичны во всех молекулах данной совокупности. МАТ содержат антигенсвязывающий участок, способный к иммунореакции с конкретным эпитопом антигена, который отличается уникальной аффинностью связывания к нему.

[00265] Термин "антигенсвязывающий участок" или "связывающая часть" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий участок сформирован аминокислотными остатками N-концевых переменных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепи. Три высокопеременных фрагмента в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемые "гипервариабельными областями", распределены между более консервативными фланкирующими фрагментами, известными как "каркасные области" или "FR-области". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые обычно присутствуют между и прилегают к гипервариабельным областям в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гипервариабельных области легкой цепи и три гипервариабельных области тяжелой цепи расположены друг относительно друга в трехмерном пространстве с формированием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связываемого антигена, и три гипервариабельных области каждой тяжелой и легкой цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR-областями". Отнесение аминокислот к каждому домену выполнено в соответствии с определениями, приведенными в Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

[00266] Как используется в настоящем изобретении, термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфичному связыванию с иммуноглобулином, scFv или Т-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфичному связыванию с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно

состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обычно имеют определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные зарядовые характеристики. Например, могут быть индуцированы антитела против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Антитело, как говорят, специфично связывает антиген, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; в некоторых вариантах осуществления ≤ 100 нМ и в некоторых вариантах осуществления ≤ 10 нМ.

[00267] Как используется в настоящем изобретении, термины "специфичное связывание", "иммунологическое связывание" и "свойства иммунологического связывания" относятся к нековалентным взаимодействиям такого типа, которые проходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, к которому специфичен иммуноглобулин. Сила или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий может быть выражена через константу диссоциации (K_d) такого взаимодействия, где меньшая K_d соответствует более высокой аффинности. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов могут быть определены количественно при использовании способов, известных в уровне техники. Один такой способ включает измерение скорости образования и диссоциации комплекса между антигенсвязывающим участком/антигеном, где такие скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, "константа скорости ассоциации" (K_{on}) и "константа скорости диссоциации" (K_{off}) могут быть определены при вычислении концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. См. Nature 361:186-87 (1993). Отношение K_{off}/K_{on} позволяет исключить все параметры, которые не относятся к аффинности, и равно константе диссоциации K_d . См. в общем Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473. Антитело согласно настоящему изобретению, как говорят, специфично связывается с мишенью, когда константа связывания (K_d) составляет ≤ 1 мкМ, в некоторых вариантах осуществления ≤ 100 нМ, в некоторых вариантах осуществления ≤ 10 нМ и в некоторых вариантах осуществления от ≤ 100 пМ до приблизительно 1 пМ, при измерении с помощью таких анализов, как анализы связывания радиоизотопно меченого лиганда или подобные анализы, известные специалистам в данной области.

[00268] Термин "выделенный полинуклеотид" при использовании в настоящем документе должен означать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторую комбинацию перечисленного, где "выделенный полинуклеотид", в силу своего происхождения: (1) не связан со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" существует в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не существует в природе как часть более протяженной последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением включают молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, показанные в настоящей заявке,

и молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы легкой цепи иммуноглобулина, показанные в настоящем документе.

[00269] Термин "выделенный белок", указанный в настоящем документе, означает белок, происходящий из кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения, или некоторую комбинацию перечисленного, где "выделенный белок", в силу своего происхождения или источника происхождения: (1) не связан с существующими в природе белками, (2) не содержит других белков из того же источника, например, не содержит мышинных белков, (3) экспрессирован клеткой из другого биологического вида, или (4) не существует в природе.

[00270] Термин "полипептид" используется в настоящем документе как общий термин для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Следовательно, нативные белковые фрагменты и аналоги являются разновидностями полипептида. Полипептиды в соответствии с изобретением включают молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина, показанные в настоящем документе, и молекулы легкой цепи иммуноглобулина, показанные в настоящем документе, а также молекулы антител, сформированные комбинациями, включающими молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина с молекулами легкой цепи иммуноглобулина, такими как молекулы каппа-легкой цепи иммуноглобулина, и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

[00271] Термин "природный" при использовании в настоящем документе применительно к объекту относится к тому, что объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лаборатории или иным образом, является природной.

[00272] Термин "функционально связанный" при использовании в настоящем документе относится к положениям компонентов, описанных выше, которые находятся в отношениях, позволяющих им функционировать согласно их назначению. Контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается при условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

[00273] Термин "контрольная последовательность" при использовании в настоящем документе относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для выполнения экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина, например, у прокариотов такие контрольные последовательности обычно включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции, а у эукариотов, как правило, такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Предполагается, что термин

"контрольные последовательности" включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых важно для экспрессии и процессинга, и также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых выгодно, например, лидерные последовательности и слитые последовательности-партнеры. Термин "полинуклеотид", как указано в настоящем документе, означает нуклеотиды длиной по меньшей мере 10 оснований, рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму нуклеотида любого типа. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

[00274] Термин олигонуклеотид, указанный в настоящем документе, включает природные и модифицированные нуклеотиды, соединенные друг с другом природными и неприродными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, обычно включающих длину 200 оснований или меньше. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину 10-60 оснований, а в некоторых вариантах осуществления - длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды обычно одноцепочечные, как, например, в случае зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для применения в конструировании генного мутанта. Олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению являются смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами.

[00275] Термин "природные нуклеотиды", указанный в настоящем документе, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", указанный в настоящем документе, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Термин "олигонуклеотидные связи", указанный в настоящем документе, включает такие олигонуклеотидные связи, как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфораниладат, фосфороамидат и т.п. См., например, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., патент США 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). При необходимости олигонуклеотид может включать метку для обнаружения.

[00276] При использовании в настоящем документе двадцать обычных аминокислот и их сокращенные обозначения соответствуют стандартному применению. См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, неприродных аминокислот, таких как α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нестандартные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидов согласно настоящему описанию. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбокситглютамат, ϵ -N, N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-

гидроксилизин, σ -N-метиларгинин, а также другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептида, используемом в настоящем документе, левое направление является N-концевым направлением, а правое направление является C-концевым направлением, в соответствии со стандартным применением и правилами.

[00277] Аналогичным образом, если не определено иное, левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей является 5'-концом, левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей указывают как 5'-направление. Направление 5'→3' присоединения растущих РНК-транскриптов указывают как направление транскрипции, области последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые расположены 5' относительно 5'-конца РНК-транскрипта, именуется "последовательностями, расположенными выше по ходу транскрипции", области последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые расположены 3' относительно 3'-конца РНК-транскрипта, именуется "последовательностями, расположенными ниже по ходу транскрипции".

[00278] Применительно к полипептидам, термин "существенная идентичность" означает, что две пептидных последовательности, при их оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT при использовании весов пропуска по умолчанию, обладают по меньшей мере 80-процентной идентичностью последовательности, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90-процентной идентичностью последовательности, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95-процентной идентичностью последовательности и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99-процентной идентичностью последовательности.

[00279] В некоторых вариантах осуществления положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

[00280] Как обсуждается в настоящем документе, незначительные вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулинов считаются включенными в настоящее описание при условии, что такие вариации в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, 90%, 95% и в некоторых вариантах осуществления 99%. В частности, предусмотрены консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены являются такими заменами, которые происходят в пределах семейства аминокислот, которые имеют родственные боковые цепи. Генетически кодируемые аминокислоты обычно подразделяются на следующие семейства: (1) кислотные аминокислоты - аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин.

Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспарат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают: (i) серин и треонин, которые относятся к семейству алифатических гидроксис-аминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, которые относятся к семейству амидсодержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые относятся к семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые относятся к семейству ароматических аминокислот. Например, разумно ожидать, что выделенная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или подобная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать существенного воздействия на связывание или свойства полученной в результате молекулы, особенно если такая замена не включает аминокислоту в участке каркасной области. Приведет ли изменение аминокислоты в функциональном пептиде, можно с легкостью определить при анализе специфичной активности производного полипептида. Анализы подробно описаны в настоящем документе. Фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулинов могут быть с легкостью получены средними специалистами в данной области. Подходящие N- и C-концы фрагментов или аналогов находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть определены при сравнении данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или коммерческими базами данных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления компьютерные методы сравнения применяют для определения мотивов последовательностей или предсказанных белковых конформационных доменов, которые присутствуют в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы определения белковых последовательностей, которые сворачиваются в известную трехмерную структуру (Bowie et al., Science 253:164 (1991)). Таким образом, предыдущие примеры демонстрируют, что специалисты в данной области могут распознать мотивы последовательности и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с настоящим описанием.

[00281] Подходящие аминокислотные замены являются заменами, которые: (1) уменьшают склонность к протеолизу, (2) уменьшают склонность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания при образовании белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания, и (5) придают или изменяют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутеины последовательности кроме природной пептидной последовательности. Например, одна или множество аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен) могут быть сделаны в природной последовательности (например, в части полипептида за пределами домена(ов), формирующего межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена не должна приводить к существенному

изменению структурных свойств исходной последовательности (например, замена аминокислоты не должна приводить к нарушению спирали, которая существует в исходной последовательности, или разрушению других типов вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры известных в уровне техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).

[00282] Термин "полипептидный фрагмент" при использовании в настоящем описании относится к полипептиду, который имеет N-концевую и/или C-концевую делецию и/или одну или более внутренних делеций, но где остальная аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в природной последовательности, полученной, например, из полноразмерной последовательности кДНК. Фрагменты, как правило, имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 14 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20 аминокислот, обычно по меньшей мере 50 аминокислот и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70 аминокислот. Термин "аналог" при использовании в настоящем документе относится к полипептидам, которые состоят из сегмента длиной по меньшей мере 25 аминокислот, который обладает существенной идентичностью с частью производной аминокислотной последовательности, и который способен специфично связываться с мишенью при подходящих для связывания условиях. Как правило, аналоги полипептида включают консервативную аминокислотную замену (или добавление, или делецию) по сравнению с природной последовательностью. Аналоги, как правило, имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50 аминокислот или больше и часто могут иметь такую же длину, что и полноразмерный природный полипептид.

[00283] Термин "средство" используется в настоящем документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

[00284] При использовании в настоящем документе термины "метка" или "меченный" относятся к включению детектируемого маркера, например, включению меченой радиоактивным изотопом аминокислоты или присоединению к полипептиду биотинильных групп, которые можно обнаружить с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена с помощью оптических или калориметрических методов). В определенных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные методы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в уровне техники и могут применяться. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения перечисленными, следующие: радиоизотопы или

радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные, биотинильные группы, заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей с лейциновыми молниями, сайты связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединены через спейсерные ножки различной длины для уменьшения потенциального стерического затруднения. Термин "фармацевтическое средство или лекарственное средство" при использовании в настоящем документе относится к химическому соединению или композиции, способной оказывать требуемое терапевтическое воздействие при правильном введении пациенту.

[00285] Другие химические термины в настоящем документе используются согласно стандартному использованию в данной области, как показано в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[00286] При использовании в настоящем документе "по существу чистый" означает, что рассматриваемый компонент является преобладающим присутствующим компонентом (т.е. в молярном отношении он представлен больше, чем какие-либо другие отдельные компоненты в композиции), и в некоторых вариантах осуществления по существу очищенная фракция является композицией, в которой рассматриваемый компонент составляет по меньшей мере приблизительно 50 процентов (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных компонентов.

[00287] Обычно по существу чистая композиция будет включать больше чем приблизительно 80 процентов всех макромолекулярных компонентов, присутствующих в композиции, в некоторых вариантах осуществления больше чем приблизительно 85%, 90%, 95% и 99%. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемый компонент очищен до существенной гомогенности (контаминирующие компоненты не могут быть обнаружены в композиции с помощью стандартных методов обнаружения), где композиция состоит по существу из одного макромолекулярного компонента.

[00288] Термин пациент включает человека и подопытных животных.

[00289] Термины индивид и пациент используются в настоящем документе попеременно.

[00290] Антитела и/или активируемые антитела согласно настоящему изобретению специфично связывают данную мишень, например, человеческий белок-мишень, такой как человеческий PDL1. Также в настоящее изобретение включены антитела и/или активируемые антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела и/или активируемые антитела, описанные в настоящем документе. Также в настоящее изобретение включены антитела и/или активируемые антитела, которые конкурируют с антителом против PDL1 и/или активируемым антителом против PDL1, описанным в настоящем документе, за связывание с PDL1, например, человеческим PDL1. Также в

настоящее изобретение включены антитела и/или активируемые антитела, которые перекрестно конкурируют с антителом против PDL1 и/или активируемым антителом против PDL1, описанным в настоящем документе, за связывание с PDL1, например, человеческим PDL1.

[00291] Специалистам в данной области известно, что без излишних экспериментов можно определить, обладает ли моноклональное антитело (например, мышинное моноклональное или гуманизированное антитело) такой же специфичностью, как и моноклональное антитело, применяемое в способах, описанных в настоящем документе, при определении, препятствует ли первое связыванию последнего с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом согласно настоящему описанию, что проявляется в уменьшении связывания моноклональным антителом согласно настоящему изобретению, то указанные два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственными эпитопами. Альтернативный способ определения, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела согласно настоящему описанию, состоит в предварительном инкубировании моноклонального антитела согласно настоящему описанию с мишенью и последующем добавлении тестируемого моноклонального антитела для определения, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать мишень. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то тогда, по всей вероятности, оно обладает такой же, или функционально эквивалентной, эпитопной специфичностью, что и моноклональное антитело согласно настоящему изобретению.

[00292] Далее изобретение будет описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Оценка переносимости антител против PDL1 при солидных опухолях и лимфомах

[00293] В данном примере оценивали безопасность, переносимость, фармакокинетику (ФК), фармакодинамику (ФД) и предварительную противоопухолевую активность одной или более доз, например однократной или многократных доз, активируемого антитела против PDL1 в качестве монотерапии или в комбинации с ипилимумабом (также известным как Ервой®), антителом против CTLA-4, или вемурафенибом (также известным как Зелбораф®), ингибитором фермента B-Raf, у пациентов с распространенными, неоперабельными солидными опухолями или лимфомой.

[00294] В этом Примере использовали активируемое антитело против PDL1, именуемое в настоящем документе как активируемое антитело против PDL1 PL07-2001-C5H9v2, которое включает следующие последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи:

Последовательность варибельной области тяжелой цепи PL07-2001-C5H9v2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRN
GIVTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:46)

Последовательность вариабельной области легкой цепи PL07-2001-C5H9v2

QQQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGSGGSSGLLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:137)

[00295] Активируемое антитело против PDL1 PL07-2001-C5H9v2 включает следующие последовательности тяжелой и легкой цепи:

Последовательность тяжелой цепи PL07-2001-C5H9v2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRN
GIVTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLG (SEQ ID NO:432)

Последовательность легкой цепи PL07-2001-C5H9v2

QQQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGSGGSSGLLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:428)

[00296] Известно, что опухоли могут уклоняться от иммунитета хозяина с помощью экспрессии лиганда белка программируемой смерти 1 (PD-L1), который негативно регулирует белок программируемой смерти 1 (PD-1), ингибирующий рецептор, экспрессируемый на активированных Т-клетках (Herbst RS et al., Nature. vol. 515: 563-67 (2014)). Антитела, направленно взаимодействующие с PD-L1, показали активность против множества раковых опухолей и проходили исследование в комбинации с другими иммунотерапиями для повышения процента пациентов с объективным ответом и длительности ответа (Iwai Y et al., J Biomed Sci., vol. 24:26 (2017)). Впрочем, значительная, опасная для жизни иммуноассоциированная токсичность (irAE) является известным токсическим действием антител, которые блокируют ось PD1/PDL1, особенно в случае применения в разнообразных комбинациях с другими иммунотерапиями, в том числе с ипилимумабом (Wolchok JD et al., N Engl J Med., vol. 369:122-33 (2013); Larkin J et al., N Engl J Med., vol. 373:23-34 (2015)), вемурафенибом, кобиметинибом, вемурафенибом/кобиметинибом, пазопанибом или осимертинибом (Ahn MJ et al., Expert Opin Drug Saf, vol. 16:465-469 (2017); Hwu P et al., Ann Oncol, vol. 27:379-400 (2016)).

[00297] Более 90% образцов опухолей от 200 пациентов с различными

злокачественными новообразованиями демонстрировали активацию активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в исследованиях *in situ* (см. Международную публикацию PCT WO/2014/107599, опубликованную 10 июля 2014 года Vasiljeva O, et al., для ознакомления с репрезентативными методиками анализа), что подтверждает присутствие в микроокружении подавляющего большинства опухолей протеаз, необходимых для обеспечения активации активируемого антитела *in vivo*. Кроме того, доклинические результаты продемонстрировали эквивалентную эффективность мышинового аналога активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 по сравнению с исходным мышинным антителом-аналогом при минимальной индукции системного аутоиммунитета у склонных к диабету мышей с диабетом без ожирения (доклад Wong C. et al., представленный на конференции CRI-CIMT-EATI-AACR; 16 сент 2015 г.; New York, NY). Мышиный аналог активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 также демонстрировал пониженное периферическое связывание с циркулирующими Т-клетками у мышей с опухолями по сравнению с исходным антителом (Wong C. et al., там же).

[00298] Исследование, описанное в настоящем документе, является открытым, многоцентровым исследованием с повышением дозы, фазы 1/2, которое проводили в нескольких частях, как показано на ФИГ. 1А и 1В, где "АА" обозначает активируемое антитело против PDL1 PL07-2001-C5H9v2.

[00299] Исследование включало в себя группы повышения дозы, получавшие активируемые антитела: группы монотерапии (Часть А и А2), одну группу комбинированной терапии ипилимумабом, но по двум отдельным схемам (Части В1 и В2), одну группу комбинированной терапии вемурафенибом (Часть С) и одну группу монотерапии в фазе расширения когорт (ФИГ. 1А не включает в себя Часть А2; ФИГ. 1В включает в себя Часть А2). В каждой части повышение дозы выполняли по схеме 3+3. Не всех участников исследования обязательно включали в Часть А2, а для тех, кого включали в Часть А2, в некоторых вариантах осуществления, включение в часть А2 требовало успешного завершения исследования уровня дозы монотерапии в Части А. Для индивидов, которых включали в Часть А2, в этой Части А2 уточняли подбор МПД/максимальной достигнутой дозы путем оценки отношения дозы/экспозиции с безопасностью и эффективностью и с уровнями активированного PL07-2001-C5H9v2 в микроокружении опухоли и в плазме у пациентов с PD-L1+ опухолями. Инициирование регистрации в когорты в Частях В1, В2 и С требовало успешного завершения следующего уровня дозы монотерапии, тестируемого по меньшей мере в Части А. Включение в Часть D, расширенную фазу, начинали после завершения повышения дозы в Части А и определения максимальной переносимой дозы (МПД). Лечение продолжали до 2 лет или до подтверждения прогрессирования заболевания, или пока токсическое действие становилось неприемлемым.

[00300] В Части А монотерапию активируемыми антителами PL07-2001-C5H9v2 вводили в указанной дозе (то есть 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 мг/кг) в/в, раз в 14 дней. Индивидам, которые были включены в Часть А2, Часть А2, монотерапию активируемыми

антителами PL07-2001-C5H9v2 вводили в указанной дозе в/в раз в 14 дней для изучения биомаркеров и эффективности при PD-L1+ опухолях. В Части В1 параллельная схема включала активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 в указанной дозе плюс ипилимумаб в дозе 3 мг/кг, вводимый в/в раз в 21 день в количестве 4 доз, с последующей монотерапией активируемым антителом PL07-2001-C5H9v2, вводимым внутривенно раз в 14 дней. В Части В2, поэтапная схема включала монотерапию активируемым антителом PL07-2001-C5H9v2, вводимым в/в каждые 14 дней в количестве 4 доз, затем активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 в указанной дозе плюс ипилимумаб, вводимый в/в раз в 21 день в количестве 4 доз с последующей монотерапией активируемым антителом PL07-2001-C5H9v2, вводимым в/в раз в 14 дней. В Части С активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 в указанной дозе вводили в/в раз в 14 дней плюс вемурафениб в дозе 960 мг/кг п/о, два раза в день. В Части D активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 вводили в МПД (определенной в Части А) в/в, раз в 14 дней. Если 30 мг/кг активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 плюс 3 мг/кг ипилимумаба считали безопасным, можно было начинать повышение дозы активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 с 10 мг/кг ипилимумаба, начиная с 10 мг/кг активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 и продолжать повышение, при переносимости, до 30 мг/кг активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2. Если для комбинации 3 мг/кг ипилимумаба не была установлена МПД, уровни дозы 10 мг/кг и 30 мг/кг активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 можно оценить в комбинации с 10 мг/кг ипилимумаба.

[00301] На ФИГ. 1А и 1В, в/в означает внутривенное введение, п/о означает пероральное введение, и МПД означает максимальный переносимый уровень дозы.

[00302] Дозы активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в Части А вводили следующим образом: первой когорте вводили 0,03 мг/кг, второй когорте вводили 0,10 мг/кг, третьей когорте вводили 0,3 мг/кг, четвертой когорте вводили 1,0 мг/кг, пятой когорте вводили 3,0 мг/кг, шестой когорте вводили 10,0 мг/кг и седьмой когорте вводили 30,0 мг/кг.

[00303] Индивидам, которых регистрировали в Части А2, активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 в Части А2 вводили следующим образом: первой когорте вводили 0,3 мг/кг, второй когорте вводили 1,0 мг/кг, третьей когорте вводили 3,0 мг/кг и четвертой когорте вводили 10,0 мг/кг.

[00304] Индивидам в Части В1 дозы вводили следующим образом: ипилимумаб вводили в/в в дозе 3 мг/кг, а активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 вводили таким образом, что первой когорте вводили 0,3 мг/кг, второй когорте вводили 1,0 мг/кг, третьей когорте вводили 3,0 мг/кг, четвертой когорте вводили 10,0 мг/кг и пятой когорте вводили 30,0 мг/кг.

[00305] Индивидам в Части В2 дозы вводили следующим образом: ипилимумаб вводили в/в в дозе 3 мг/кг, а активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 вводили таким образом, что первой когорте вводили 3,0 мг/кг, второй когорте вводили 10,0 мг/кг и третьей когорте вводили 30,0 мг/кг, четвертой когорте вводили 10,0 мг/кг и пятой когорте

вводили 30,0 мг/кг.

[00306] Индивидам в Части С дозы вводили следующим образом: вемурафениб вводили п/о в дозе 960 мг/кг, а активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 вводили таким образом, что первой когорте вводили 1,0 мг/кг, второй когорте вводили 3,0 мг/кг и третьей когорте вводили 10,0 мг/кг, и четвертой когорте вводили 30,0 мг/кг.

[00307] Индивидам в Части D дозы вводили следующим образом: активируемое антитело PL07-2001-C5H9v2 вводили в МПД.

[00308] В каждой части исследования повышение дозы вводимого активируемого антитела против PDL1 проводили по схеме 3+3, которая представляет собой схему на основе правила, в которой самый низкий уровень дозы определяли для первой когорты, дозу адаптивно повышали или понижали в зависимости от наличия наблюдаемых дозопонижающих токсических явлений (ДЛТ), и адаптивное повышение или понижение повторяли, пока не была достигнута максимальная переносимая доза (МПД). В Части А каждого индивида регистрировали в когорты введения дозы 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг, и последующие уровни дозы соответствовали схеме 3+3.

[00309] В этом исследовании для включения в Часть А2, как показано на ФИГ. 1В, требовалось успешное завершение исследования уровня дозы монотерапии в Части А. В Часть А2 будут включены по меньшей мере еще шесть пациентов с PD-L1+ раком при каждой указанной дозе, включая минимум по 2 пациента в когорте с тимомой, карциномой тимуса или эпителиальной опухолью тимуса. В Части А2 будут уточнять МПД/максимально достигнутую дозу (МДД), для оценки зависимости между дозой/экспозицией и безопасностью, эффективностью и фармакодинамическими биомаркерами, а также уровнями активированных антител в микроокружении опухоли и в плазме.

[00310] В этом исследовании для начала включения в когорты в Частях В1, В2 и С на ФИГ. 1А или 1В требовалось успешное завершение следующего уровня дозы монотерапии, исследованного, по меньшей мере, в Части А. Включение в Часть D начинали после завершения повышения дозы в Части А и определения максимальной переносимой дозы. Лечение продолжали до 2 лет или до подтверждения прогрессирования заболевания, или до неприемлемого токсического действия.

[00311] В этом исследовании, при включении Части А2, до 175 пациентов включали в когорты повышения дозы (1-6 пациентов в когорты дозы в Части А, приблизительно 6 пациентов в когорты дозы в Части А2, и по 3-6 пациентов в когорты дозы в Частях В1, В2 и С). Приблизительно 20 пациентов включали в расширенную когорту дозы (Часть D). Если Часть А2 не была включена, регистрировали до 150 пациентов, как указано выше, исключая Часть А2. Основные критерии включения зарегистрированных пациентов представлены в Таблице А ниже.

Таблица А. Основные критерии включения.

Все части	Возраст ≥ 18 лет Показатель общего состояния по шкале ECOG 0-1
------------------	--

Часть А	<p>Распространенная, неоперабельная солидная опухоль или лимфома без доступного стандартного лечения</p> <p>Не получал иммунотерапии (включая терапию ингибиторами PD-1/PD-L1 и CTLA-4)</p> <p>Иммунотерапия недоступна для лечения заболевания пациента</p>
Часть А2 (необязательно)	<p>Такие же требования, как для Части А, и PD-L1+ статус (оценка пропорции опухоли по меньшей мере 1% окрашивания мембран)</p> <p>Необходимо получение согласия на участие в анализе на биомаркеры, участок локализация опухоли должен быть безопасен для проведения биопсии</p>
Часть В1	<p>Распространенная, неоперабельная солидная опухоль или лимфома без доступного стандартного лечения</p> <p>Не получал иммунотерапии</p> <p>Иммунотерапия недоступна для лечения заболевания пациента</p>
Часть В2	<p>Распространенная, неоперабельная солидная опухоль или лимфома без доступного стандартного лечения</p> <p>Предыдущее лечение ингибитором PD-1/PD-L1 (прекращение лечения по иным причинам кроме токсического действия)</p> <p>Не получал ингибиторов CTLA-4</p>
Часть С	<p>Распространенная, неоперабельная меланома</p> <p>Положительный статус мутации BRAFV600E</p> <p>Не получал ингибиторов BRAF</p> <p>Не получал ингибиторов PD-1/PD-L1 и/или иммунотерапии</p> <p>Не получал иммунотерапии</p> <p>Иммунотерапия недоступна для лечения заболевания пациента</p>
Часть D	<p>Распространенная, неоперабельная опухоль PDL1-чувствительного типа</p> <p>Поддающееся измерению заболевание</p> <p>PD-L1 положительный или неизвестный статус (PD-L1 отрицательный статус не подтвержден)</p> <p>Не получал иммунотерапии</p> <p>Иммунотерапия недоступна для лечения заболевания пациента</p>

<p>Критерии исключения, которые могут применяться в некоторых вариантах осуществления</p>	<p>Предыдущая терапия с применением схемы, включающей Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR).</p> <p>Случаи тяжелых аллергических или анафилактических реакций на терапию человеческими моноклональными антителами или известная гиперчувствительность к любому терапевтическому препарату Probody в анамнезе.</p> <p>Активная или перенесенная увеальная, глазная меланома или меланома слизистых оболочек. Заболевание, ассоциированное с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), хронический гепатит В или С.</p> <p>Перенесенные или текущие активные аутоиммунные заболевания, включающие, без ограничения, воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунный гепатит, системный склероз, системную красную волчанку, аутоиммунный васкулит, аутоиммунные нейропатии или инсулинозависимый сахарный диабет 1 типа.</p> <p>Перенесенный синдром или патологическое состояние(я), которое требует терапии системными стероидами (>10 мг суточной дозы преднизона) или иммунодепрессантами.</p> <p>Трансплантация аллогенной ткани/паренхиматозного органа в анамнезе, предыдущая трансплантация стволовых клеток или костного мозга.</p> <p>Химиотерапия, биохимиотерапия, лучевая терапия или иммунотерапия, или любое лечение в клиническом исследовании в течение 30 дней до получения какого-либо исследуемого лекарственного средства.</p> <p>Полостная операция (требующая общей анестезии) в течение 3 месяцев или небольшая операция (исключая биопсию, проводимую с местной/наружной анестезией) или лечение гамма-ножом в течение 14 дней (с адекватным заживлением) до введения какого-либо исследуемого лекарственного средства.</p>
--	---

Сокращения: CTLA-4, антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4; ECOG, Восточная объединенная онкологическая группа; PD-1, рецептор программируемой смерти 1; PD-L1, лиганд рецептора программируемой смерти 1.

В некоторых вариантах осуществления, при определении в когорты, пациентов с известным статусом PD-L1 определяли в Часть А, однако статус PD-L1 не являлся критерием включения/исключения.

[00312] Основными конечными показателями для данного исследования являются:

(i) безопасность и переносимость активизируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 отдельно или в комбинации с ипилимумабом или вемурафенибом, и/или (ii) максимальная переносимая доза и дозолимитирующая токсичность активизируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 отдельно или в комбинации с ипилимумабом или вемурафенибом.

[00313] Вторичные конечные показатели данного исследования могут включать любой из следующих показателей или их любую комбинацию: объективный ответ согласно Критериям оценки ответа при солидных опухолях версии 1.1 (RECIST v 1.1), иммунозависимые критерии RECIST или модифицированная Чезоном Классификация лимфом Лугано; время до ответа; длительность ответа; выживание без прогрессирования;

процент пациентов с антителами против лекарственных средств; фармакокинетический профиль введения однократной и многократных доз одного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 и активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в комбинации с ипилимумабом или вемурафенибом; и/или общая выживаемость.

[00314] Дополнительные конечные показатели/цели данного исследования могут включать одно или более следующих показателей или их любую комбинацию: потенциальные прогностические маркеры активности активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2; активность протеаз и степень расщепления активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в опухоли и периферической крови; и/или иммуномодулирующая активность активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в образцах биопсии, полученных во время лечения.

[00315] Следующие оценки являются примерными и не предназначены для ограничения. В некоторых вариантах осуществления их выполняют при каждом посещении в исследовании: нежелательные явления, объективное обследование, основные физиологические показатели, общий анализ крови, биохимический анализ крови, В-симптомы (пациенты с лимфомой), общее состояние по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) и сопутствующие лекарственные препараты. Визуализацию для оценки ответа опухоли выполняли каждые 8 недель в течение первых 12 месяцев, а затем каждые 12 недель после этого. Образцы крови для анализов фармакокинетики, фармакодинамики и биомаркеров получали в заранее установленные моменты времени. После введения последней дозы исследуемого препарата каждые 3 месяца пациентов обследовали на предмет прогрессирования заболевания и общей выживаемости до прекращения исследования или смерти. В некоторых вариантах осуществления собрали образцы биопсии. В некоторых вариантах осуществления архивные образцы ткани или свежие образцы биопсии были предоставлены на начало исследования. В некоторых вариантах осуществления пациенты в Части A2 подвергались по меньшей мере одной биопсии опухоли во время лечения. В некоторых вариантах осуществления пациенты в Части B2 подвергались по меньшей мере одной биопсии опухоли во время лечения. В некоторых вариантах эти пациенты имели поддающееся измерению заболевание.

[00316] Несколько трансляционных стратегий/способов использовали для исследования, например, наличия активирующей активируемое антитело протеазной активности, активации активируемого антитела, например, протеаза-зависимой активации активируемого антитела, присутствия мишени (PDL1), захвата мишени, ингибирования PDL1 или ингибирования других путей PD-1, профиля иммунного ответа в опухоли и других биологических эффектов. Такие стратегии/способы могут включать одно или более из следующего или их любую комбинацию: (a) активация активируемого антитела, например, в образцах биопсии или крови, например, в плазме, при использовании, например, (i) анализа WES, который включает капиллярный электрофорез с иммунодетектированием; см., например, брошюру ProteinSimple Simple Western WES,

и/или (ii) анализ, который позволяет обнаруживать активацию активируемых антител протеазами, такой как один из анализов, раскрытых в WO/2014/107599, там же; (b) оценка фармакодинамических биомаркеров, например, (i) панель экспрессии генов NANOSTRING, например, в образце биопсии, (ii) ИГХ, например, образца биопсии, для обнаружения инфильтрации иммунных клеток, и/или (iii) оценка с помощью панели цитокинов LUMINEX, например, образца плазмы; и/или (c) оценка экспрессии PD-L1, например, в образце биопсии, например, с помощью ИГХ. В некоторых вариантах осуществления будет использоваться иммуно-ПЭТ визуализация.

[00317] Пример анализа WES, в котором сравнивают количество расщепленного и интактного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в доклинических образцах опухоли и плазмы, показан на ФИГ. 2.

[00318] В вышеописанной части повышения дозы оценивали фармакокинетику (ФК) у пациентов, получавших однократную дозу монотерапии PL07-2001-C5H9v2. Образцы для исследования ФК собирали часто после введения первой дозы PL07-2001-C5H9v2 с последующим периодическим сбором. Аналиты, количественно определяемые в образцах плазмы, включали интактное (нерасщепленное) активируемое антитело (то есть форму пролекарства) и общее количество пролекарства/интактной формы и расщепленной формы PL07-2001-C5H9v2 (представляющее суммарное количество интактного и активированного антитела). Предварительные данные ФК при однократном введении дозы собирали у пациентов, включенных в часть повышения дозы в вышеописанных исследованиях, получавших однократную дозу 0,03-30,0 мг/кг PL07-2001-C5H9v2 в качестве монотерапии.

[00319] Концентрации интактного и общего (интактное плюс активированное) PL07-2001-C5H9v2 определяли в образцах плазмы с помощью сертифицированного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ МС/МС) с нижним пределом количественного обнаружения для каждого аналита 0,657 нМ. Магнитные гранулы, покрытые белком А, использовали для обогащения иммуноглобулина (включая интактное и активированное PL07-2001-C5H9v2) в образцах плазмы с K₂EDTA. Связанные белки расщепляли трипсином и определяли два пептидных фрагмента, уникальные для PL07-2001-C5H9v2: один пептид из тяжелой цепи, который присутствует как в интактной, так и в активированной форме PL07-2001-C5H9v2 (для количественной оценки общего количества PL07-2001-C5H9v2) и один пептид, который присутствует в интактной (активируемой) форме PL07-2001-C5H9v2, но не присутствует в активированной форме PL07-2001-C5H9v2 (для количественной оценки интактного PL07-2001-C5H9v2). Полученный после этапов захвата антител и расщепления экстракт исследовали с помощью ВЭЖХ с МС/МС детектированием при использовании электрораспыления положительных ионов. Результаты показаны на Фигурах 8А и 8В, на которых показана медианная концентрация в плазме интактного PL07-2001-C5H9v2 (нМ) (Фигура 8А) и общее количество PL07-2001-C5H9v2 (т.е. интактное и активированное (нМ), Фигура 8В), соответственно, в зависимости от времени (день) после введения до 30

мг/кг q2w для когорт А и А2, Курс 1, Доза 1.

[00320] Предварительные данные оценки ФК при введении однократной дозы указывают, что PL07-2001-C5H9v2 циркулирует преимущественно в интактной форме, как пролекарство. По-видимому, монотонное изменение оценок клиренса и объема распределения при уровне дозы от 0,1 до 30 мг/кг не наблюдается. Механистическая модель ФК указывает, что опосредованное мишенью распределение лекарственного средства (TMDD) может не являться важным фактором, определяющим клиренс интактного, защищенного PL07-2001-C5H9v2 в оцениваемом диапазоне доз.

[00321] Что касается оценки PL07-2001-C5H9v2 в качестве монотерапии в когорте с повышением дозы у пациентов с распространенными, ранее подвергавшимися тяжелой терапии солидными опухолями, подходящие пациенты включали тех, которые не получали ингибиторы PD-1, PD-L1 и CTLA-4 при недоступности иммунотерапии (ИМТ) в качестве стандарта лечения при их заболевании. PL07-2001-C5H9v2 вводили в/в каждые 14 дней в когортах доз в диапазоне от 0,03 до 30 мг/кг. Двадцать два пациента с медианным возрастом 65 лет (диапазон 32-81) были зарегистрированы с медианным числом предыдущих противоопухолевых терапий, составившим 3 (диапазон 1-13).

[00322] Наблюдали следующие предварительные результаты: наблюдали 1 дозолIMITирующее токсическое явление (ДЛТ) (фебрильная нейтропения 3 степени; 3 мг/кг); максимальная переносимая доза (МПД) не была достигнута. У 2 пациентов наблюдали связанные с лечением события 3-4 степени, соответственно: фебрильная нейтропения/тромбоцитопения (3 мг/кг) и повышение АСТ/АЛТ (30 мг/кг). При всех уровнях дозы лучший ответ по изменению целевых очагов относительно исходных показателей у 17 подлежащих оценке пациентов включал 2 PR (тимомы и PD-L1-отрицательный ТНРМЖ), 11 SD и 4 PD. У 7/17 (41%) подлежащих оценке пациентов наблюдали уменьшение целевых очагов относительно исходных показателей согласно RECIST v1.1. При уровнях дозы ≥ 3 мг/кг, 5/8 индивидов (63%) демонстрировали уменьшение целевых очагов относительно исходных показателей. Таким образом, предварительные данные указывают, что PL07-2001-C5H9v2 у пациентов после тяжелой терапии с ИМТ-наивными солидными опухолями, при заболевании у которых блокада контрольных точек недоступна в качестве стандарта лечения, показало контролируемый профиль безопасности с сигналами противоопухолевой активности.

[00323] Примерно через четыре месяца провели дополнительный анализ данных после получения вышеуказанных результатов. На дату прекращения сбора данных в Части А было зарегистрировано 22 пациента, включая 2 пациентов, которые все еще получали лечение. Двадцать пациентов прекратили лечение по следующим причинам: радиологическое или клиническое прогрессирование заболевания (n=16), прекращение исследования по собственному желанию (n=2) или неблагоприятное явление (n=2). Индивиды имели одну из различных форм рака, включая, например, карциному матки, карциному пищевода, карциному поджелудочной железы, кастрационно-резистентную карциному предстательной железы, карциному прямой кишки, тимому или рак тимуса и

Продолжительность лечения, средняя (диапазон), месяцы	5,6 (4-7)	3,5 (1-6)	1,8 (2-2)	4,4 (4-6)	2,5 (0-9)	5,9 (2-8)	2,5 (2-4)	3,5 (0-9)
---	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Фармакокинетический анализ

[00326] Предварительные фармакокинетические данные при введении однократной дозы PL07-2001-C5H9v2 в качестве монотерапии показывают, что PL07-2001-C5H9v2: (a) циркулирует преимущественно в виде интактного пролекарства (96% интактной формы при дозе 30 мг/кг); и (b) по-видимому, лишь минимально зависит от опосредованного мишенью распределения лекарственного средства при низких дозах. Для сравнения, ингибитор PD-L1 атезолизумаб, по-видимому, демонстрирует нелинейную ФК ниже уровня дозы 1 мг/кг. См. публикацию R.S. Herbst, et al., "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients," Nature (2014 November 27) 515(7528): 563-567. Проценты оцениваемых пациентов (n=20) с ответами опухолей представлены в Таблице 5

[00327] Таблица 5. Лучший ответ опухоли на лечение у подлежащих оценке пациентов^a согласно RECIST¹ v1.1, n (%)

Доза PL07-2001-C5H9v2, мг/кг	0,03 n=2	0,1 n=2	0,3 n=2	1,0 n=3	3,0 n=5	10,0 n=3	30,0 n=3	Все подлежащие оценке пациенты N=20
Наилучший общий ответ, n (%)								
Частичный ответ ^b	0	0	0	0	1 (20,0)	2 (66,7)	0	3 (15,0)
Стабилизация заболевания	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (33,3)	2 (40,0) ^c	0	2 (66,7)	8 (40,0)
Прогрессирующее заболевание	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (66,7)	1 (20,0)	1 (33,3)	0	7 (35,0)
Не подлежащие оценке	0	0	0	0	1 (20,0)	0	1 (33,3)	2 (10,0)

¹RECIST: Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях.

^aПодлежащие оценке пациенты являются пациентами с соответствующей оценкой заболевания на начало исследования и ≥ 1 оценкой опухоли после начала исследования.

^bВключает 2 пациентов с неподтвержденным частичным ответом.

^cВключает 1 пациента с неполным ответом/непрогрессирующим заболеванием, который не имеет поддающегося измерению заболевания на начало исследования.

[00328] Повышение дозы до 30 мг/кг было выполнено, а максимальная переносимая доза (МПД) не была достигнута. Целевые очаги уменьшились относительно исходного показателя у 8 из 19 пациентов (42%) с поддающимся измерению заболеванием на начало исследования, как показано на Фигуре 9А. Целевые очаги уменьшились относительно исходного показателя при уровнях дозы ≥ 3 мг/кг у 6 из 10 пациентов (60%). Процентное изменение опухолевой нагрузки в динамике представлено на Фигуре 9В.

Исследования с конкретными случаями

[00329] Пациент А имел рак тимуса с высокой исходной экспрессией PD-L1 и

получал лечение PL07-2001-C5H9v2 в дозе 3 мг/кг. Пациент продемонстрировал ответ на лечение после 2 недель и имел 48% снижение медиастинальной массы. Пациент прекратил лечение из-за нейтропении.

[00330] Пациент В имел трижды негативный рак молочной железы с микросателлитно стабильной низкой мутационной нагрузкой опухоли (4 мутации/мегабаза) и PD-L1 отрицательный, и получал лечение PL07-2001-C5H9v2 в дозе 10 мг/кг. Определение стадии после лечения показало подтвержденный частичный объективный ответ. Результаты показаны в Таблице 6.

[00331] Таблица 6.

Лимфатический узел	Скрининг 14 Авг 2017	C2D56 5 Дек 2017	C4D56 27 Мар 2018
Правый подмышечный	30 мм	12 мм	9 мм
Прекаринальный	17 мм	9 мм	6 мм
Подкожный	25 мм	14 мм	19 мм

[00332] Анализ биомаркеров в парных образцах биопсии опухоли Пациента С (рак пищевода; PL07-2001-C5H9v2, 30 мг/кг), продемонстрировал 3-кратное увеличение инфильтрации CD8+ Т-клеток через 4 недели лечения.

Выводы

[00333] МПД не была определена при дозах до 30 мг/кг. PL07-2001-C5H9v2 активируется *in vivo* и проявляет биологическую активность, подтвержденную следующим: (а) 3 объективных ответа у 20 подлежащих оценке пациентов (15%), включая пациентов с отрицательной экспрессией PD-L1; (b) 3-кратное увеличение инфильтрации CD8+ Т-клеток после 4 недель лечения. PL07-2001-C5H9v2 показало сниженное связывание в периферической ткани, на что указывала преобладающая циркуляция в интактной форме пролекарства (96% интактной формы при дозе 30 мг/кг); и благоприятный профиль безопасности только с 2 пациентами, испытывавшими связанные с лечением АЕ 3 степени.

[00334] Основные цели Части В1 исследования состояли в оценке безопасности и переносимости и в определении максимальной переносимой дозы (МПД) и дозолIMITирующей токсичности (ДЛТ) PL07-2001-C5H9v2 при параллельном введении в комбинированной схеме с ипилимумабом. Вторичные цели состоят в получении предварительного подтверждения противоопухолевой активности у пациентов, получавших PL07-001-C5H9v2 в комбинации с ипилимумабом, при использовании процента пациентов с ответом (Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях (RECIST) v 1.1), времени до ответа, продолжительности ответа и выживаемости без прогрессирования. Пациенты имели возраст ≥ 18 лет с оценкой общего состояния по шкале Восточной объединенной онкологической группы 0-1. Для включения в Часть В1, пациенты ($n \leq 42$) должны: (а) иметь любую метастатическую или распространенную неоперабельную солидную опухоль или лимфому (исключая эпителиальную опухоль тимуса, тимому или рак тимуса) (поддающееся или не поддающееся измерению

заболевание): и (b) ранее не подвергаться иммунотерапии, включая терапию ингибиторами PD-1/PD-L1 и CTLA-4, и иметь тип опухоли, не одобренный для применения ингибиторов иммунных контрольных точек. PL07-2001-C5H9v2 (0,3, 1,0, 3,0 и 10 мг/кг) в комбинации с ипилимумабом (3,0 мг/кг или 10 мг/кг для наиболее высокого уровня дозы PL07-2001-C5H9v2) вводят внутривенно каждый 21 день в течение 4 курсов, с последующей монотерапией PL07-2001-C5H9v2 раз в 14 дней.

[00335] Пациенты с прогрессирующими солидными опухолями получали PL07-2001-C5H9v2+ипилимумаб в параллельной схеме (Часть В1 исследования). Подходящие для включения пациенты ранее не получали ингибиторов PD-1, PD-L1 и CTLA-4. Визуализацию для оценки ответа опухоли проводили каждые 8 недель в течение первых 12 месяцев, а затем каждые 12 недель. После введения последней дозы исследуемого препарата каждые 3 месяца пациентов будут оценивать на предмет прогрессирования заболевания и общей выживаемости до прекращения исследования или смерти. Архивные ткани или свежие образцы биопсии предоставляют в начале исследования. Серийные образцы крови для анализа фармакокинетики (ФК) собирают для определения ФК профиля PL07-2001-C5H9v2 в комбинации с ипилимумабом. Участвующие пациенты предоставляют серийные образцы крови для измерения поисковых биомаркеров иммуномодуляции.

[00336] Плановые дозы: PL07-2001-C5H9v2 0,3-30 мг/кг внутривенно (в/в) раз в 21 день+ипилимумаб 3 мг/кг или 10 мг/кг в/в раз в 21 день, 4 курса, с последующей монотерапией PL07-2001-C5H9v2 раз в 14 дней. При получении предварительных результатов в Части В1 зарегистрировали 9 пациентов. Средний возраст составлял 44 года (диапазон 28-70); 6 пациентов (67%) мужского пола. Среднее число предыдущих противоопухолевых терапий составляло 4 (диапазон 2-18). На момент прекращения сбора данных лечение продолжали 6 пациентов. Среднее число доз PL07-2001-C5H9v2 (0,3 и 1 мг/кг) и ипилимумаба (3 мг/кг) составило 2 (диапазон 2-10) и 2 (диапазон 2-4), соответственно. Наблюдали 1 случай ДЛТ (затруднение дыхания 3 степени, 0,3 мг/кг PL07-2001-C5H9v2+3 мг/кг ипилимумаба). МПД не была достигнута, и повышение дозы продолжили. У 6 пациентов (67%) наблюдали связанные с лечением нежелательные явления (ТРАЕ) 1-2 степени. У 2 пациентов (22%) наблюдали четыре ТРАЕ 3 степени, включавшие колит, пневмонит и повышение АСТ и АЛТ (0,3 мг/кг PL07-2001-C5H9v2) + 3 мг/кг ипилимумаба). На дату прекращения сбора данных 1 из 4 подлежащих оценке пациентов показал уменьшение целевого очага на 31% относительно исходного показателя (0,3 мг/кг PL07-2001-C5H9v2, ПКК анального канала, МСН стабильная и промежуточная мутационная нагрузка опухоли). Через несколько дней у этого пациента подтверждали PR с 56% уменьшением целевого очага. Предварительные данные позволяют предположить, что PL07-2001-C5H9v2+ипилимумаб демонстрирует контролируемый профиль безопасности и сигналы противоопухолевой активности.

[00337] Следующее прекращение сбора данных сделали после получения вышеуказанных предварительных результатов. На эту более позднюю дату прекращения

сбора данных N=16 пациентов получали следующие дозы PL07-2001-C5H9v2+ипилимуаб, 3,0 мг/кг. 0,3, n=6, 1,0, n=3, 3,0, n=3, 10, n=4. Исходные показатели представлены в Таблице 7.

[00338] Таблица 7. Исходные показатели

	Все пациенты N=16
Медианный возраст, лет (диапазон)	60 (28-70)
Пол, n (%)	8 (50,0)
Мужчины	8 (50,0)
Женщины	
Раса, n (%)	13 (81,3)
Белые	1 (6,3)
Азиаты	2 (12,5)
Не указана/неизвестна/другое	
Оценка общего состояния по шкале ECOG, n (%)	6 (37,5)
0	10 (62,5)
1	
Число предыдущих противоопухолевых терапий, медиана (диапазон)	3 (1-12)
Типы рака ^a , n (%)	
Карцинома поджелудочной железы	2 (12,5)
Другой ^a	14 (87,5)

^aПо одному пациенту имели плоскоклеточную карциному анального канала, карциному молочной железы (ER+), карциному шейки матки, карциному толстой кишки, рак желудка, глиобластому, остеосаркому, карциному слюнных желез, рак неизвестной первичной локализации (РНПЛ), мелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный нейроэндокринный рак предстательной железы, карциному яичка, трижды негативный рак молочной железы и плоскоклеточную карциному головы и шеи.

[00339] На момент анализа 4 пациента (25,0%) все еще проходили лечение. 12 пациентов прекратили лечение из-за прогрессирования заболевания (n=8), ухудшения симптомов (n=3) или смерти (n=1),

[00340] Средняя (диапазон) продолжительность лечения приведена в Таблице 8.

Доза PL07-2001-C5H9v2 (мг/кг) + ипилимуаб 3,0 мг/кг	0,3 n=6	1,0 n=3	3,0 n=3	10,0 n=4	Все пациенты N=16
Время лечения, среднее (диапазон), месяцы	3,0 (1-10)	4,6 (3-6)	3,4 (1-4)	1,8 (1-3)	3,1 (1-10)

Ответ опухолей

[00341] Лучшие ответы опухолей на лечение представлены в Таблице 9.

[00342] Таблица 9. Лучшие ответы опухолей у подлежащих оценке пациентов^a согласно RECIST v1.1, n (%)

Доза PL07-2001-C5H9v2 (мг/кг) + ипилимуаб (мг/кг)	0,3+3,0 n=5	1,0+3,0 n=3	3,0+3,0 n=2	10,0+3,0 n=2	Все подлежащие оценке пациенты N=12
---	----------------	----------------	----------------	-----------------	---

Процент пациентов с объективным ответом ^b	1 (20,0)	1 (33,3)	1 (50,0)	0	3 (25,0)
Полный ответ	1 (20,0)	0	0	0	1 (8,3)
Частичный ответ	0	1 (33,3)	1 (50,0)	0	2 (16,7)
Стабилизация заболевания	0	1 (33,3)	0	0	1 (8,3)
Прогрессирование заболевания	4 (80,0)	1 (33,3)	1 (50,0)	2 (100,0)	8 (66,7)

^aПодлежащие оценке пациенты являются пациентами с соответствующей оценкой болезни на начало исследования и ≥ 1 оценкой опухоли после начала исследования.

^bВключает пациентов с неподтвержденным объективным ответом.

[00343] Среди подлежащих оценке пациентов (n=12), лучший ответ опухолей на лечение являлся следующим:

(a) Полный объективный ответ (n=1): плоскоклеточная карцинома анального канала (0,3 мг/кг PL07-2001-C5H9v2, 3 мг/кг ипилимумаба); PD-L1 отрицательная, МСС, низкая ТМВ, ВПЧ+; и

(b) Частичный ответ (n=2): рак яичка и неизвестной первичной локализации (вероятно тонкая кишка). Целевые очаги уменьшились относительно исходного показателя у 3 из 10 (30%) пациентов с поддающимся измерению заболеванием на начало исследования, как показано на Фигуре 10А. Процентное изменение опухолевой нагрузки в динамике представлено на Фигуре 10В.

Исследования отдельных случаев

[00344] Пациент А имел плоскоклеточную карциному анального канала с промежуточной мутационной нагрузкой опухоли (9 мутаций/мегабаза), микросателлитно стабильную, ВПЧ-положительную и с неизвестным статусом PD-L1. Пациент получал 0,3 мг/кг PL07-2001-C5H9v2+3 мг/кг ипилимумаба и имел неподтвержденный полный объективный обвет при последующем определении стадии.

[00345] Пациент В имел карциному тонкой кишки и отрицательный статус PD-L1. Пациент получал 3 мг/кг PL07-2001-C5H9v2+3 мг/кг ипилимумаба и имел неподтвержденный полный объективный обвет при последующем определении стадии.

Выводы

[00346] При ранних наблюдениях безопасности в этом исследовании повышения дозы комбинации активируемого антитела против PD-L1, PL07-2001-C5H9v2, и ипилимумаба, 3 мг/кг, регистрировали связанные с лечением АЕ на уровне ниже отмеченного для других ингибиторов пути PD-1 в комбинации с ипилимумабом. Никаких новых сигналов по безопасности комбинации активируемого антитела против PD-L1, PL07-2001-C5H9v2, + ипилимумаб, 3 мг/кг, не наблюдали. Предварительные результаты эффективности показали 1 полный ответ и 2 частичных ответа (3/12, 25%).

ПРИМЕР 2. Получение антител, которые связывают активированные и интактные активируемые антитела против PDL1

[00347] Исследования, представленные в настоящем документе, были разработаны

с целью получения и оценки антител, которые связывают активируемые антитела против PDL1 согласно изобретению.

[00348] В исследованиях, представленных в настоящем документе, использовали активируемое антитело против PDL1, именуемое в настоящем документе как PL07-2001-C5H9v2, которое включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:432 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:428, как показано ниже.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи PL07-2001-C5H9v2 (SEQ ID NO:432)
 EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVT
 VYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

Аминокислотная последовательность легкой цепи PL07-2001-C5H9v2 (SEQ ID NO:428)
 QGQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSS
 LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00349] Мышей иммунизировали в GenScript Biotech Corporation пептидным антигеном CQQDNGYPSTFGGGT (SEQ ID NO:1203), включающим CDR3 VL активируемого антитела против PDL1 PL07-2001-C5H9v2, который был конъюгирован с гемоцианином лимфы морского блюдечка *Megathura crenulata* (KLH) в качестве белка-носителя при использовании методики, показанной ниже в Таблице 3. Шесть мышей возрастом три месяца (3 Balb/c и 3 C56) иммунизировали согласно указанному ниже протоколу. Во время каждой инъекции аликвоту антигена размораживали и объединяли с полным адъювантом Фрейнда (CFA) для первой инъекции или с неполным адъювантом Фрейнда (IFA) для последующих инъекций.

Таблица 10. Схема иммунизации

Методика	Схема	Доза и путь введения
Забор крови иммунизации	до T = -4 дня	
Первичная иммунизация	T = 0 дней	50 мкг/животное, п/к
Буст-иммунизация 1	T = 14 дней	25 мкг/животное, п/к

Контрольный забор крови 1	T= 21 день	
Буст-иммунизация 2	T= 28 дней	25 мкг/животное, п/к
Контрольный забор крови 2	T= 35 дней	
Последняя иммунизация	буст- T= 50±7 дней	25 мкг/животное, в/в
Слияние клеток	4 дня после последней буст- иммунизации	

[00350] Сывороточные титры против свободного пептида, а также контрольного антигена (человеческого IgG) оценивали в образцах крови с помощью стандартной методики ИФА. Образцы крови оценивали против полноразмерного активируемого антитела в человеческой плазме с помощью Вестерн-блоттинга. Результаты показали, что все мыши имели сопоставимые титры против соответствующего иммуногена. Антисыворотки тестировали против активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 на системе WesTM (ProteinSimple), и двух мышей отобрали для слияния клеток.

[00351] Мышиные моноклональные антитела получали следующим образом: лимфоциты этих двух мышей использовали для слияния с целью получения гибридом и сеяли в сорок 96-луночных планшетов (400 миллионов лимфоцитов на мышь). Планшеты помещали в инкубаторы для культур тканей при стандартных условиях.

ПРИМЕР 3. Скрининг клонов гибридом и анализ антител

[00352] В данном Примере описан скрининг и исследование клонов гибридом и антител, полученных против активируемого антитела к PDL1, PL07-2001-C5H9v2.

[00353] Супернатант гибридомы из исходных клонов подвергали скринингу в GenScript против короткого пептида, содержащего CDR3 VL активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2, с помощью непрямого ИФА. Коротко, планшеты с высокой степенью связывания GenScript покрывали пептидом-BSA в концентрации 1 мкг/мл, 100 мкл/лунка. Супернатант использовали без разбавления. Антисыворотку в разведении 1:1000 использовали в качестве положительного контроля. Конъюгат AffiniPure антитела козы против IgG мыши с пероксидазой, специфичный к фрагменту Fc γ (с минимальной перекрестной реактивностью с сывороточным альбумином человека, коровы или лошади, также называемый min X Hu, Bov, Hrs Sr Prot) использовали в качестве вторичного антитела. Двадцать клонов с положительными сигналами затем подвергали скринингу против антитела к PDL1, C5H9v2, исходного антитела, использованного для получения активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2, и 5 мкг/мл человеческого IgG. Антителом против PDL1 C5H9v2 покрывали планшеты с высокой степенью связывания в концентрации 1 мкг/мл, 100 мкл/лунка. Человеческий IgG наносили на планшеты с высокой степенью связывания в концентрации 5 мкг/мл, 100 мкл/лунка. Вестерн-блоттинг также проводили на этих 20 клонах при использовании 200 нг денатурированного и восстановленного антитела против PDL1, C5H9v2, в качестве мишени. В качестве финального скрининга супернатанты 20 клонов также оценивали на системе Wes. Коротко, все 20 клонов тестировали против 1 мкг/мл одноплечевого активированного

активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в 0,1× буфере для образцов и 1 мкг/мл одноплечевого активированного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в человеческой плазме 1:100. Лучшие 6 клонов по интенсивности и специфичности связывания с активируемым антителом PL07-2001-C5H9v2, обозначенные как 17G1, 18F1, 19H12 и 23H6, 21H10 и 27C1, затем подвергали скринингу против одноплечевого активированного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в концентрациях 0,11 и 0,33 мкг/мл в человеческой плазме 1:100. Результаты показаны на ФИГ. 3А и ФИГ. 3В, на которых показан скрининг антиидиотипических (anti-id) клонов активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 против 37% одноплечевого активированного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 в концентрации 0,11, 0,33 и 1 мкг/мл в человеческой плазме при 1:100. ФИГ. 3А является электрофореграммой, на которой показано 17G1 обнаружение снижаемых концентраций одноплечевого активированного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2 (1, 0,33 и 0,11 мкг/мл). На ФИГ.3В показан относительный процент активации лучших 6 клонов одноплечевого активированного активируемого антитела PL07-2001-C5H9v2. Относительная скорость активации сохраняется при разных концентрациях. Клоны 21H10 и 27C1 имеют более низкую аффинность, что привело к отсутствию данных для концентрации 0,11 мкг/мл.

ПРИМЕР 4. Специфичность связывания антител, которые связывают активируемое антитело против PDL1

[00354] В данном Примере описана способность антител согласно изобретению связывать активируемое антитело против PDL1 PL07-2001-C5H9v2.

[00355] Для проверки специфичности связывания антитела 17G1 с активируемым антителом против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, 160 нг/мл одноплечевого активированного активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, вводили либо в человеческую плазму (разведение 1-100 в PBS), либо в лизат опухоли легкого. Коротко, гомогенаты опухоли приготавливали в лизисном буфере Thermo Scientific Pierce™ IP (номер по каталогу 87788) с добавлением смеси ингибиторов протеаз для однократного применения Thermo Scientific Halt™ Protease Inhibitor Single Use Cocktail Kit (номер по каталогу 78430) с использованием Varocycler (Pressure Biosciences). Антитело 17G1 также тестировали против такой же плазмы и опухоли, в которые не добавляли одноплечевое активированное активируемое антитело против PDL1, PL07-2001-C5H9v2. Затем анализируемые образцы исследовали с помощью капиллярного электрофореза Wes на основе метода иммуноанализа, в котором разделение осуществляли с помощью SDS электрофореза (Protein Simple), также называемого системой Wes. На ФИГ. 4А-4D продемонстрирована высокая специфичность связывания антитела 17G1 с активируемым антителом против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, введенным в человеческую плазму (ФИГ. 4С) и образцы лизатов опухоли легкого (ФИГ. 4D). На ФИГ. 4А и 4В продемонстрировано фоновое связывание антитела 17G1 в образцах человеческой плазмы и лизатов опухоли легкого, соответственно, в отсутствие активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2.

ПРИМЕР 5. Количественное определение активированных и интактных

активируемых антител против PDL1 в биологических образцах

[00356] В данном Примере описана способность антитела 17G1 обнаруживать активированное и интактное активируемое антитело против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, в образцах плазмы и ксенотрансплантатных опухолей мышей, которым вводили активируемое антитело против PDL1, PL07-2001-C5H9v2.

[00357] Активируемое антитело против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, имеет такую конструкцию, что его расщепляют (т.е. активируют) различные сериновые протеазы и матриксные металлопротеиназы (ММП), которые обычно ассоциированы с опухолями человека (LeBeau et al, Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed epithelium. Proc Natl Acad Sci 2013; 110: 93-98; Overall & Kleinfeld, 2006, Validating Matrix Metalloproteinases as Drug Targets and Anti-Targets for Cancer Therapy. Nature Review Cancer, 6, 227-239) и которые обладают низкой активностью в крови или в нормальных тканях. Для оценки и измерения уровня активации активируемого антитела в образцах опухоли и плазмы, образцы исследовали с помощью системы Wes, которая позволяет обнаруживать интактное и активированное активируемое антитело против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, как описано в настоящем документе. При помощи этой системы было показано, что активируемые антитела остаются в основном интактными (т.е. неактивированными) в кровотоке, но активируются в мышечных ксенотрансплантатных опухолях.

[00358] В основном использовали следующую методику: модель ксенотрансплантатной опухоли на мышах была создана с помощью п/к имплантации 3×10^6 клеток MDA-MB-231-luc2-4D3LN в 30 мкл бессывороточной среды, содержащей матригель (1:1), самкам голых мышей возрастом 7-8 недель. Измерения массы тела и опухолей производили и регистрировали два раза в неделю на протяжении всего исследования. После того как опухоли достигли объема 200-500 мм³, мышей рандомизировали в 3 группы с эквивалентным средним объемом опухоли и вводили им активируемое антитело против PDL1, PL07-2001-C5H9v2. Через четыре дня после обработки опухоль и плазму (гепарин) собирали и хранили при -80°C до анализа. Гомогенаты опухолей (т.е. лизаты) приготавливали в лизисном буфере Thermo Scientific Pierce™ IP (номер по каталогу 87788) с добавлением смеси ингибиторов протеаз для однократного применения Thermo Scientific Halt™ Protease Inhibitor Single Use Cocktail Kit (номер по каталогу 78430) с помощью Varocycler (Pressure Biosciences). Приблизительно 0,8 мг/мл белкового лизата в лизисном буфере IP с ингибитором протеаз HALT/ЭДТА и образцами плазмы, разведенными 1 к 100 в PBS, анализировали с помощью системы Wes, как описано в настоящем документе.

[00359] Образцы исследовали при использовании методики, аналогичной описанной в Руководстве по проведению простого анализа размера белка на основе Вестерн-блоттинга, разработанного ProteinSimple (http://www.proteinsimple.com/documents/042-889_Rev1_Size_Assay_Development_Guide.pdf), при условии, что этот метод позволяет разделять интактную и активированную формы. В некоторых вариантах

осуществления для облегчения разделения интактной и активированной форм можно изменять любой один или более из следующих параметров: изменять, например, увеличивать или уменьшать, время пробега в концентрирующем геле, изменять, например, увеличивать или уменьшать, время обработки образцов и/или изменять, например, увеличивать или уменьшать, время разделения.

[00360] Как правило, одну часть (например, 1 мкл) 5× флуоресцентного мастер-микса (ProteinSimple) объединяли с 4 частями (например, 4 мкл) анализируемого лизата в микроцентрифужной пробирке. Для скрининга и анализа антител использовали от 1 нг до 5 мкг активируемого антитела против PDL1 PL07-2001-C5H9v2. Для биологических образцов, содержащих опухолевую ткань, использовали 0,8 мг/мл белкового лизата в лизисном буфере IP с ингибитором протеаз HALT/ЭДТА. Образцы плазмы разводили 1 к 100 в PBS. Первичные антитела использовали в концентрации 1,7 нг/мл (разводили в разбавителе для антител Antibody diluent 2 (номер по кат. ProteinSimple 042-203). Вторичное мышиное антитело (ProteinSimple) использовали в чистом виде. Планшеты с образцами, приготовленными в соответствии с Руководством по проведению простого анализа размера белка на основе Вестерн-блоттинга, центрифугировали в течение 5 минут при 2500 об/мин (~1000 ×g) при комнатной температуре перед анализом в системе Wes (ProteinSimple).

[00361] На ФИГ. 5А и 5В сравнивается специфичное обнаружение интактного и активированного активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2, при использовании антиидиотипического антитела 17G1 согласно изобретению и коммерческого антитела A110UK против IgG человека (адсорбированного против иммуноглобулина яванского макака козьего антитела против IgG человека) производства American Qualex. Антитело 17G1 согласно изобретению было способно обнаруживать активируемое антитело против PDL1 PL07-2001-C5H9v2 в плазме мышей, которым вводили всего лишь 0,1 мг/кг активируемого антитела против PDL1 PL07-2001-C5H9v2 (ФИГ. 5В), по сравнению с коммерческим антителом к человеческому IgG, которое было способно только на минимальном уровне обнаруживать активируемое антитело против PDL1 PL07-2001-C5H9v2 в плазме мышей, которым вводили 10 мг/кг активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2 (ФИГ. 5А).

[00362] На ФИГ. 6А и 6В показана избирательная активация активируемого антитела против PDL1 PL07-2001-C5H9v2 в образцах опухоли по сравнению с образцами плазмы. В этом исследовании мыши с ксенотрансплантатами MDA-MD-231 получали 1 мг/кг активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2. Образцы опухолей и плазмы собирали в день 4 (96 часов). Гомогенат образцов опухоли и плазмы исследовали в системе Wes при использовании антитела 17G1 для обнаружения. Образцы плазмы показали присутствие интактного активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2 (ФИГ. 6В), тогда как микроокружение опухоли активировало, по меньшей мере, часть активируемого антитела против PDL1, PL07-2001-C5H9v2 (ФИГ. 6А).

ПРИМЕР 6. Количественное определение активированных и интактных

активируемых антител против PDL1 в биологических образцах

[00363] В данном Примере продемонстрировано, что система Wes может применяться для различных типов ксенотрансплантатных опухолей и при различных концентрациях вводимых доз.

[00364] Коротко, модель ксенотрансплантатной опухоли на мышах получали путем п/к имплантации 5×10^6 клеток SAS в 100 мкл бессывороточной среды самкам голых мышей возрастом 7-8 недель. Измерения массы тела и опухолей производили и регистрировали два раза в неделю в течение всего исследования. После того как опухоли достигли объема 450-550 мм³, мышей рандомизировали в 3 группы с эквивалентным средним объемом опухолей и вводили дозу 0,1 мг/кг активируемого антитела против PDL1 PL07-2001-C5H9v2. Через четыре дня после лечения образцы опухоли и плазмы (гепарин) собирали и хранили при -80°C до анализа. Гомогенаты опухолей (т.е. лизаты) приготавливали в лизисном буфере Thermo Scientific Pierce™ IP (номер по каталогу 87788) с добавленным смеси ингибиторов протеаз Thermo Scientific Halt™ Protease Inhibitor Single Use Cocktail Kit (номер по каталогу 78430) с помощью Barocycler (Pressure Biosciences). Приблизительно 0,8 мг/мл белкового лизата в лизисном буфере IP с ингибитором протеаз Halt/ЭДТА и образцами плазмы, разведенными 1 к 250 в PBS, исследовали в системе Wes при использовании антитела 17G1 для обнаружения. На ФИГ. 7А и 7В показана избирательная активация активируемых терапевтических средств на основе антитела в образцах опухоли по сравнению с образцами плазмы.

Другие варианты осуществления

[00365] Хотя изобретение было описано в соответствии с подробным описанием, предыдущее описание предназначено для иллюстрации, а не ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующего.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активируемое антитело против PDL1, включающее:

а. антитело (АВ), которое специфично связывается с человеческим PDL1, где АВ включает:

i. переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3), включающую аминокислотную последовательность или SEQ ID NO:235; и

ii. переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228;

б. расщепляемую часть (СМ), соединенную с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

с. маскирующую часть (ММ), соединенную с СМ,

для применения при лечении, облегчении симптома или задержке прогрессирования рака у индивида, и где активируемое антитело вводят внутривенно в дозе приблизительно от 0,3 мг/кг до 30 мг/кг

2. Активируемое антитело против PDL1, включающее:

а. антитело (АВ), которое специфично связывается с человеческим PDL1, где АВ включает:

i. переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3), включающую аминокислотную последовательность или SEQ ID NO:235; и

ii. переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228;

б. расщепляемую часть (СМ), соединенную с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

с. маскирующую часть (ММ), соединенную с СМ,

для применения при лечении, облегчении симптома или задержке прогрессирования рака у индивида, и где активируемое антитело вводят внутривенно в фиксированной дозе приблизительно 24-2400 мг.

3. Активируемое антитело против PDL1 по п.1 или 2, где MM ингибирует связывание АВ с человеческим PDL1, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии.

4. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1-3, где MM включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63.

5. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1-4, где CM включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:377.

6. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1-5, где АВ включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58 или SEQ ID NO:137.

7. Активируемое антитело против PDL1 по п.1 или 2, где активируемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1008, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:432.

8. Активируемое антитело против PDL1 по п.1 или 2, где активируемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:428, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:432.

9. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет приблизительно от 3 мг/кг до 10 мг/кг.

10. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет приблизительно от 3 мг/кг до 15 мг/кг.

11. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 0,3 мг/кг.

12. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 1 мг/кг.

13. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 3 мг/кг.

14. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 6 мг/кг.

15. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 10 мг/кг.

16. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 15 мг/кг.

17. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.1 и 3-8, где доза составляет 30 мг/кг.

18. Активируемое антитело против PDL1 по п.2-8, где фиксированная доза составляет 240 мг
19. Активируемое антитело против PDL1 по п.2-8, где фиксированная доза составляет 480 мг.
20. Активируемое антитело против PDL1 по п.2-8, где фиксированная доза составляет 800 мг.
21. Активируемое антитело против PDL1 по п.2-8, где фиксированная доза составляет 1200 мг.
22. Активируемое антитело против PDL1 по п.2-8, где фиксированная доза составляет 2400 мг.
23. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 7-30 дней.
24. Активируемое антитело против PDL1 по п.23, где активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 14 дней.
25. Активируемое антитело против PDL1 по п.23, где активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 21 день.
26. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где активируемое антитело вводят в качестве монотерапии.
27. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где активируемое антителом вводят в качестве компонента комбинированной терапии.
28. Активируемое антитело против PDL1 по п.27, где комбинированная терапия включает введение дозы антитела против CTLA-4 или ингибитора B-RAF
29. Активируемое антитело против PDL1 по п.28, где антителом против CTLA-4 является ипилимумаб.
30. Активируемое антитело против PDL1 по п.27 или 28, где антитело против CTLA-4 вводят внутривенно.
31. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-30, где антитело против CTLA-4 вводят в дозе 3 мг/кг, 6 мг/кг или 10 мг/кг.
32. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-30, где антитело против CTLA-4 вводят в фиксированной дозе 240 мг, 480 мг или 800 мг.
33. Активируемое антитело против PDL1 по п.28, где ингибитором B-RAF является вемурафениб.
34. Активируемое антитело против PDL1 по п.28 или 33, где ингибитор B-RAF вводят перорально.
35. Активируемое антитело против PDL1 по п.28, 33 или 34, где ингибитор B-RAF вводят в дозе 960 мг.
36. Активируемое антитело против PDL1 по п.28, 33 или 34, где ингибитор B-RAF вводят в дозе 875 мг.
37. Активируемое антитело против PDL1 по п.28, 33-36, где этап введения включает введение активируемого антитела и ингибитора B-RAF в течение одного и того

же периода времени.

38. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28, 33-37, где дозу ингибитора B-RAF вводят два раза в день.

39. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28, 33-38, где вводят по меньшей мере по 4 дозы активируемого антитела и ингибитора B-RAF.

40. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-32, где этапы введения включают введение многократных доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в течение первого периода времени, с последующим введением многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение второго периода времени.

41. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-32, где дозу активируемого антитела и дозу антитела против CTLA-4 вводят параллельно в качестве комбинированной терапии раз в 21 день в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии раз в 14 дней.

42. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-32, где этапы введения включают введение многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение первого периода времени, с последующим параллельным введением многократных доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени.

43. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-32, где этап введения включает: (i) введение многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение первого периода времени, (ii) последующее введение многократных доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени, и (iii) последующее введение многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение третьего периода времени.

44. Активируемое антитело против PDL1 по любому из пп.28-32, где дозу активируемого антитела вводят в качестве монотерапии раз в 14 дней в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела и дозы антитела против CTLA-4, вводимых в качестве комбинированной терапии раз в 21 день в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии раз в 14 дней.

45. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где рак представляет собой распространенную, неоперабельную солидную опухоль или лимфому.

46. Активируемое антитело против PDL1 по п.45. где распространенная неоперабельная опухоль является опухолью PDL1-чувствительного типа.

47. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где рак является карциномой.

48. Активируемое антитело против PDL1 по п.47, где карцинома плоскоклеточная карцинома.

49. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где рак

является плоскоклеточной карциномой анального канала, базальноклеточной карциномой, раком мочевого пузыря, раком костей, колоректальной карциномой, раком молочной железы, карциноидом, кастрационно-резистентным раком предстательной железы (КРРПЖ), карциномой шейки матки, раком толстой и прямой кишки (CRC), раком толстой кишки плоскоклеточной карциномой кожи, раком эндометрия, раком пищевода, карциномой желудка, раком гастроэзофагеального перехода, глиобластомой/смешанной глиомой, глиомой, раком головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномой, гемобластозом, раком печени, раком легкого, меланомой, карциномой из клеток Меркеля, множественной миеломой, раком носоглотки, остеосаркомой, раком яичника, раком поджелудочной железы, перитонеальной карциномой, недифференцированной плеоморфной саркомой, раком предстательной железы, карциномой прямой кишки, раком почки, саркомой, карциномой слюнных желез, плоскоклеточной карциномой, раком желудка, раком яичка, карциномой тимуса, эпителиальной опухолью тимуса, тимомой, раком щитовидной железы, урогенитальным раком, уротелиальным раком, карциномой матки или саркомой матки.

50. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где рак представляет собой рак с высокой Мутационной нагрузкой опухоли (hTMB),

51. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где рак молочной железы является трижды негативным раком молочной железы или эстроген-рецептор-положительным раком молочной железы.

52. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где гемобластоз является лимфомой или лейкозом.

53. Активируемое антитело против PDL1 по п.53, где лимфома является В-клеточной лимфомой, Т-клеточной лимфомой, лимфомой Ходжкина или ВЭБ-ассоциированной лимфомой, первичной медиастинальной В-клеточной лимфомой.

54. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где рак является меланомой.

55. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где колоректальная карцинома является карциномой тонкой кишки или аденокарциномой тонкой кишки.

56. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, рак толстой кишки является аденокарциномой толстой кишки,

57. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, рак легкого является немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) или мелкоклеточным раком легкого.

58. Активируемое антитело против PDL1 по п.57, где НМРЛ является неплоскоклеточным НМРЛ или плоскоклеточным НМРЛ.

59. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где рак предстательной железы является мелкоклеточным нейроэндокринным раком предстательной железы.

60. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где рак почки, почечно-клеточная карцинома или саркома почки.

61. Активируемое антитело против PDL1 по п.49, где рак является недифференцированной плеоморфной саркомой, аденокарциномой тонкой кишки,

карциномой из клеток Меркеля, карциномой тимуса, плоскоклеточной карциномой анального канала, плоскоклеточной карциномой кожи или трижды негативным раком молочной железы.

62. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где индивид демонстрирует одну или более следующих характеристик:

- a. ранее не подвергался лечению ингибитором PD-1/PDL1,
- b. ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4,
- c. имеет положительный статус мутации BRAF^{V600E},
- d. ранее не подвергался лечению ингибитором BRAF,
- e. PDL1-положительный,
- f. PDL1-неизвестный, и
- g. ранее проходил лечение ингибитором PD1/PDL1.

63. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где индивиду не доступно другое стандартное лечение.

64. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где терапия ингибитором PD1/PDL1 не одобрена для формы рака индивида.

65. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где индивид ранее проходил лечение ингибитором PD-1/PDL1, где лечение ингибитором PD-1/PDL1 было прекращено по иным причинам кроме токсического действия, и где индивид ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4.

66. Активируемое антитело против PDL1 по любому из предыдущих пп., где индивид не подвергался иммунотерапии.

67. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования рака у индивида, включающий введение внутривенно в дозе приблизительно от 0,3 мг/кг до 30 мг/кг активируемого антитела против PDL1 индивиду, где активируемое антитело включает:

a. антитело (AB), которое специфично связывается с человеческим PDL1, где AB включает:

i. переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3), включающую аминокислотную последовательность или SEQ ID NO:235; и

ii. переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228;

в. расщепляемую часть (СМ), соединенную с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

с. маскирующую часть (ММ), соединенную с СМ.

68. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования злокачественной опухоли у индивида, включающий введение внутривенно в фиксированной дозе приблизительно от 24 до 2400 мг активируемого антитела против PDL1 индивиду, где активируемое антитело включает:

а. антитело (АВ), которое специфично связывается с PDL1 человека, где АВ включает:

i. переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, определяющую комплементарность область 2 (CDRH2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:246, и определяющую комплементарность область 3 (CDRH3), включающую аминокислотную последовательность или SEQ ID NO:235; и

ii. переменную область легкой цепи, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDRL1), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, определяющую комплементарность область легкой цепи 2, (CDRL2), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDRL3), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228;

в. расщепляемую часть (СМ), соединенную с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

с. маскирующую часть (ММ), соединенную с АВ.

69. Способ по п.67 или 68, где ММ ингибирует связывание АВ с человеческим PDL1, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии.

70. Способ по любому из пп.67-69, где ММ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63.

71. Способ по любому из пп.67-70, где СМ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:377.

72. Способ по любому из пп.67-71, где АВ включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, и переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58 или SEQ ID NO:137.

73. Способ по п.67 или 68, где активируемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1008, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:432.

74. Способ по п.67 или 68, где активируемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:428, и тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:432.

75. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет приблизительно от 3 мг/кг до 10 мг/кг.
76. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет приблизительно от 3 мг/кг до 15 мг/кг.
77. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 0,3 мг/кг.
78. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 1 мг/кг.
79. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 3 мг/кг.
80. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 6 мг/кг.
81. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 10 мг/кг.
82. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 15 мг/кг.
83. Способ по любому из пп.67 и 69-74, где доза составляет 30 мг/кг.
84. Способ по п.68-74, где фиксированная доза составляет 240 мг
85. Способ по п.68-74, где фиксированная доза составляет 480 мг.
86. Способ по п.68-74, где фиксированная доза составляет 800 мг.
87. Способ по п.68-74, где фиксированная доза составляет 1200 мг.
88. Способ по п.68-74, где фиксированная доза составляет 2400 мг.
89. Способ по любому из предыдущих пп., где активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 7-30 дней.
90. Способ по п.89, где активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 14 дней.
91. Способ по п.89, где активируемое антитело вводят по схеме одну дозу раз в 21 день.
92. Способ по любому из предыдущих пп., где активируемое антитело вводят в качестве монотерапии.
93. Способ по любому из предыдущих пп., где активируемое антитело вводят в качестве компонента комбинированной терапии.
94. Способ по п.93, где комбинированная терапия включает введение дозы антитела против CTLA-4 или ингибитора B-RAF.
95. Способ по п.94, где антителом против CTLA-4 является ипилимумаб.
96. Способ 93 или 94, где антитело против CTLA-4 вводят внутривенно.
97. Способ по любому из пп.94-96, где антитело против CTLA-4 вводят в дозе 3 мг/кг, 6 мг/кг или 10 мг/кг.
98. Способ по любому из пп.94-96, где антитело против CTLA-4 вводят в фиксированной дозе 240 мг, 480 мг или 800 мг.
99. Способ по п.94, где ингибитором B-RAF является вемурафениб.
100. Способ по п.94 или 99, где ингибитор B-RAF вводят перорально.
101. Способ по п.94, 99 или 100, где ингибитор B-RAF вводят в дозе 960 мг.
102. Способ по п.94, 99 или 100, где ингибитор B-RAF вводят в дозе 875 мг.
103. Способ по п.94, 99-102, где этап введения включает введения активируемого антитела и ингибитора B-RAF в течение одного и того периода времени.

104. Способ по любому из пп.94, 99-102, где дозу ингибитора B-RAF вводят два раза в день.

105. Способ по любому из пп.94, 99-102, где вводят по меньшей мере по 4 дозы активируемого антитела и ингибитора B-RAF.

106. Способ по любому из пп.94-98, где этапы введения включают введение многократных доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в течение первого периода времени, с последующим введением многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение второго периода времени.

107. Способ по любому из пп.94-98, где дозу активируемого антитела и дозу антитела против CTLA-4 вводят параллельно в качестве комбинированной терапии раз в 21 день в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии раз в 14 дней.

108. Способ по любому из пп.94-98, где этапы введения включают введение многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение первого периода времени, с последующим параллельным введением многократных доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени.

109. Способ по любому из пп.94-98, где этап введения включает: (i) введение многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение первого периода времени, (ii) последующее введение многократных доз активируемого антитела и антитела против CTLA-4 в качестве комбинированной терапии в течение второго периода времени, и (iii) последующее введение многократных доз активируемого антитела в качестве монотерапии в течение третьего периода времени.

110. Способ по любому из пп.94-98, где дозу активируемого антитела вводят в качестве монотерапии раз в 14 дней в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела и дозы антитела против CTLA-4, вводимых в качестве комбинированной терапии раз в 21 день, в количестве 4 доз, с последующим введением дозы активируемого антитела в качестве монотерапии раз в 14 дней.

111. Способ по любому из предыдущих пп., где злокачественной опухолью является распространенной, неоперабельной солидной опухоль или лимфомой.

112. Способ по п.111, где распространенная, неоперабельная опухоль является типом PDL1-чувствительной опухоли.

113. Способ по любому из предыдущих пп., где рак является карциномой.

114. Способ по п.113, где карцинома плоскоклеточная карцинома.

115. Способ по любому из предыдущих пп., где рак является плоскоклеточной карциномой анального канала, базальноклеточной карциномой, раком мочевого пузыря, раком костей, колоректальной карциномой, раком молочной железы, карциномой, кастрационно-резистентным раком предстательной железы (КРРПЖ), карциномой шейки матки, раком толстой и прямой кишки (CRC), раком толстой кишки плоскоклеточной карциномой кожи, раком эндометрия, раком пищевода, карциномой желудка, раком

гастроэзофагеального перехода, глиобластомой/смешанной глиомой, глиомой, раком головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномой, гемобластозом, раком печени, раком легкого, меланомой, карциномой из клеток Меркеля, множественной миеломой, раком носоглотки, остеосаркомой, раком яичника, раком поджелудочной железы, перитонеальной карциномой, недифференцированной плеоморфной саркомой, раком предстательной железы, карциномой прямой кишки, раком почки, саркомой, карциномой слюнных желез, плоскоклеточной карциномой, раком желудка, раком яичка, карциномой тимуса, эпителиальной опухолью тимуса, тимомой, раком щитовидной железы, урогенитальным раком, уротелиальным раком, карциномой матки или саркомой матки.

116. Способ по любому из предыдущих пп., где злокачественная опухоль представляет собой опухоль с высокой мутационной нагрузкой (hTMB).

117. Способ по п.115, где рак молочной железы является трижды негативным раком молочной железы или эстроген-рецептор-положительным раком молочной железы.

118. Способ по п.115, где гемобластоз является лимфомой или лейкозом.

119. Способ по п.118, где лимфома является В-клеточной лимфомой, Т-клеточной лимфомой, лимфомой Ходжкина или ВЭБ-ассоциированной лимфомой, первичной медиастинальной В-клеточной лимфомой.

120. Способ по п.115, где рак является меланомой.

121. Способ по п.115, где колоректальная карцинома является карциномой тонкой кишки или аденокарциномой тонкой кишки.

122. Способ по п.115, рак толстой кишки является аденокарциномой толстой кишки.

123. Способ по п.115, рак легкого является немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) или мелкоклеточным раком легкого.

124. Способ по п.123, где НМРЛ является неплоскоклеточным НМРЛ или плоскоклеточным НМРЛ.

125. Способ по п.115, где рак предстательной железы является мелкоклеточным нейроэндокринным раком предстательной железы.

126. Способ по п.115, где рак почки является почечно-клеточной карциномой или саркомой почки.

127. Способ по п.115, где рак является недифференцированной плеоморфной саркомой, аденокарциномой тонкой кишки, карциномой из клеток Меркеля, карциномой тимуса, плоскоклеточной карциномой анального канала, плоскоклеточной карциномой кожи или трижды негативным раком молочной железы.

128. Способ по любому из предыдущих пп., где индивид демонстрирует одну или более следующих характеристик:

- a. ранее не подвергался лечению ингибитором PD-1/PDL1,
- b. ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4,
- c. имеет положительный статус BRAF^{V600E},
- d. ранее не подвергался лечению ингибитором BRAF,

- e. PDL1-положительный,
- f. PDL1-неизвестный, и
- g. ранее подвергался лечению ингибитором PD1/PDL1.

129. Способ по любому из предыдущих пп., где индивиду недоступно другое стандартное лечение.

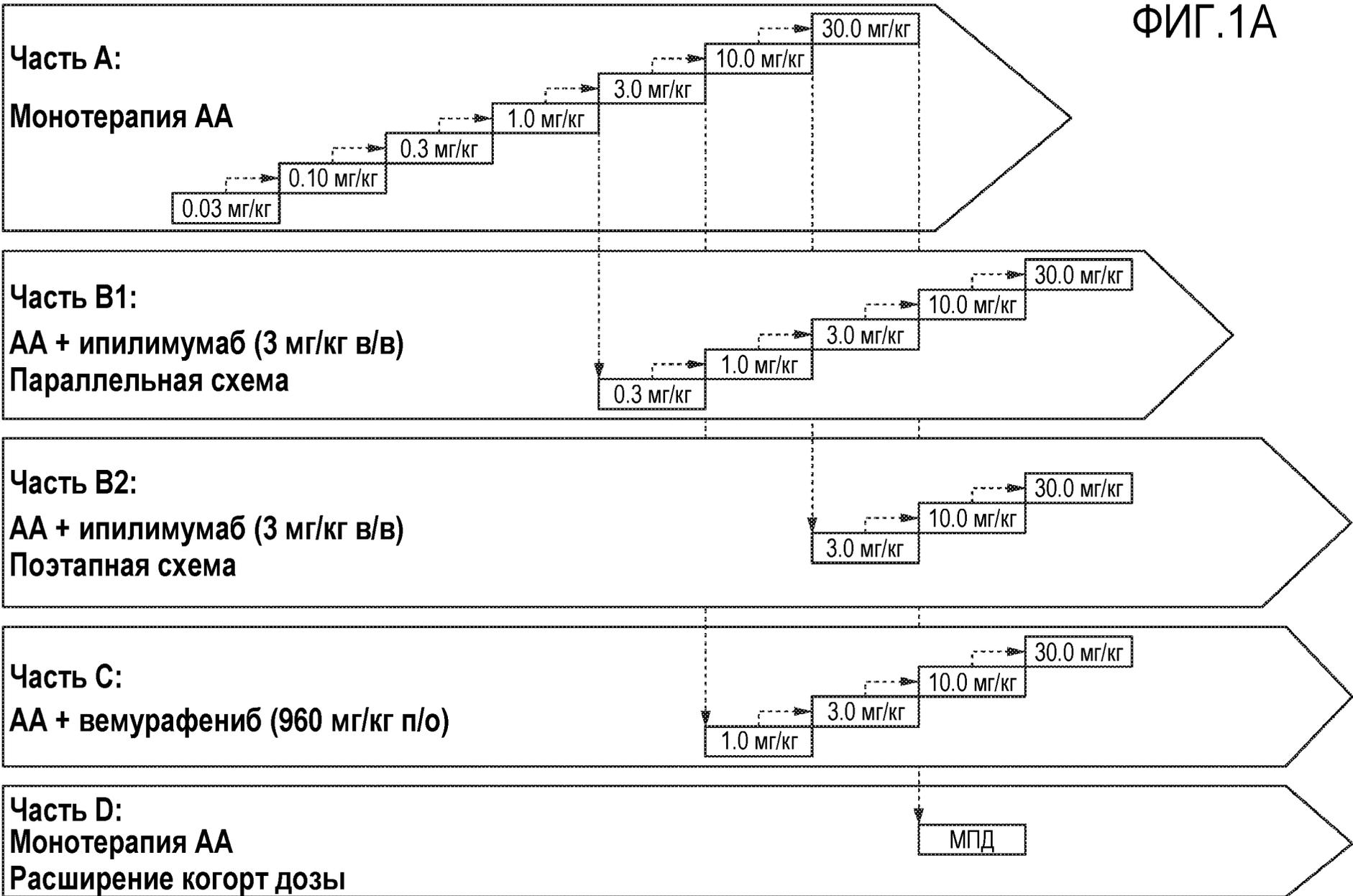
130. Способ по любому из предыдущих пп., где терапия ингибитором PD1/PDL1 не одобрена для формы рака индивиду.

131. Способ по любому из предыдущих пп., где индивид ранее проходил лечение ингибитором PD-1/PDL1, где лечение ингибитором PD-1/PDL1 было прекращено по иным причинам кроме токсичности, и где индивид ранее не подвергался лечению ингибитором CTLA-4.

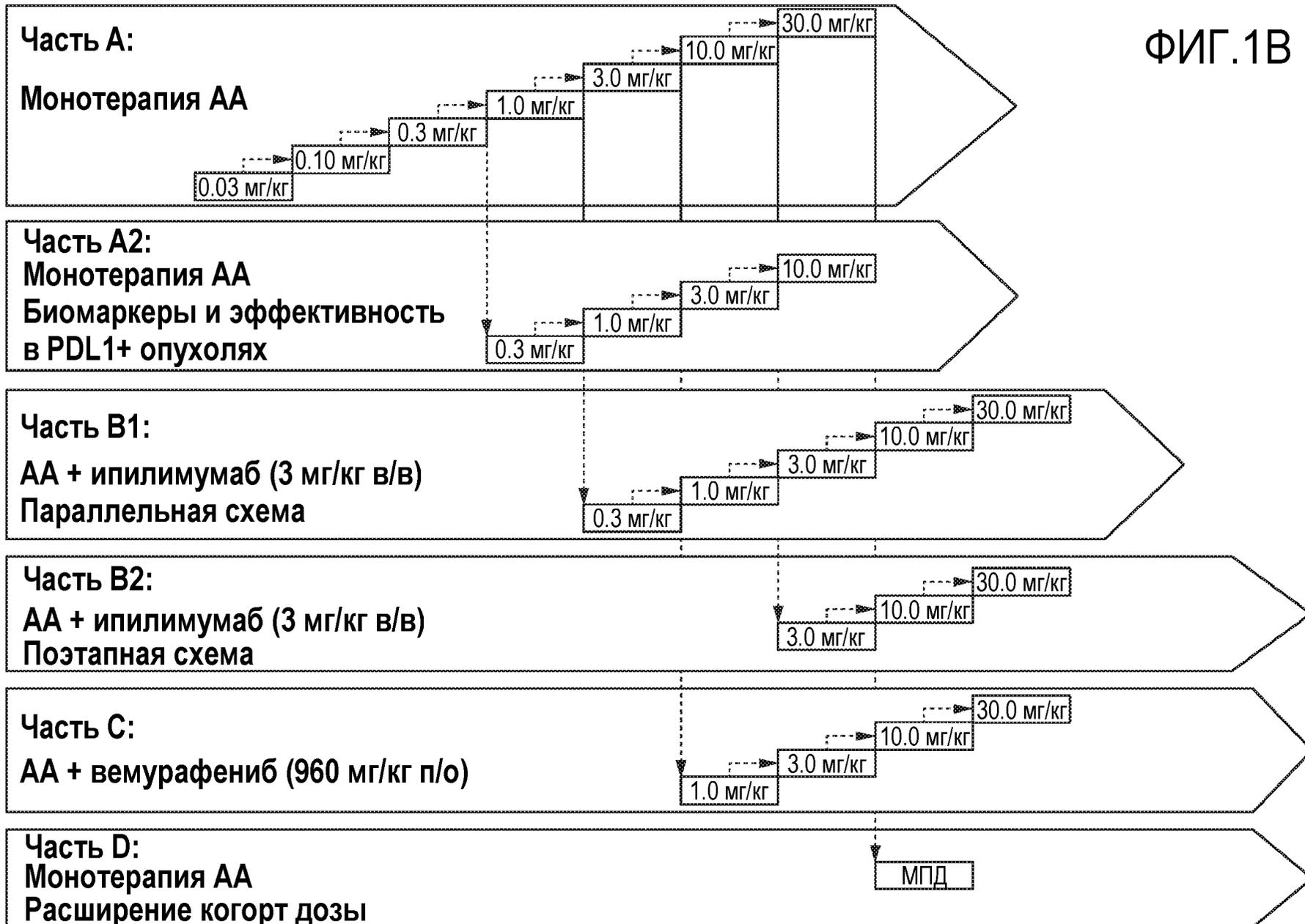
132. Способ по любому из предыдущих пп., где индивид - не подвергался иммунотерапии.

По доверенности

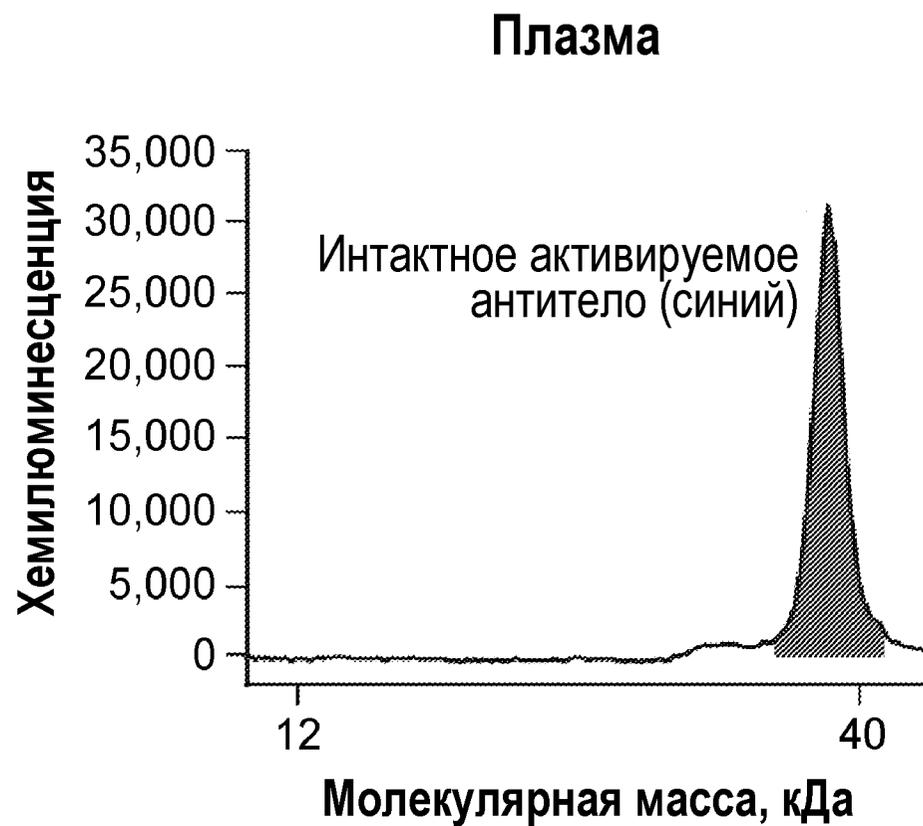
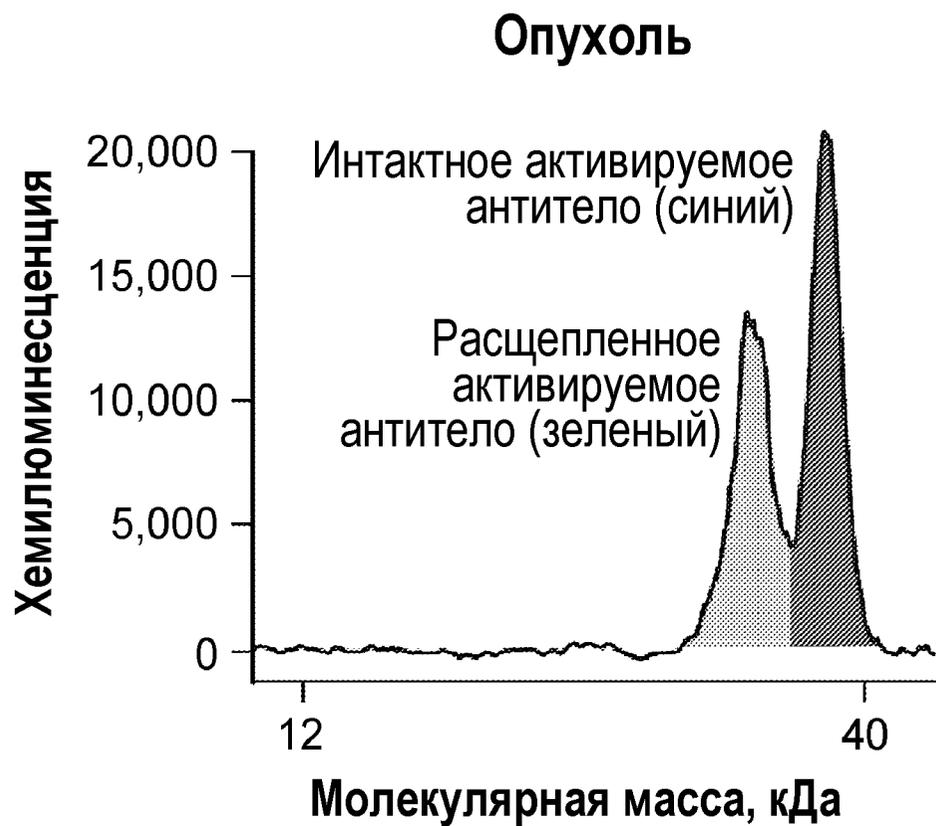
ФИГ.1А



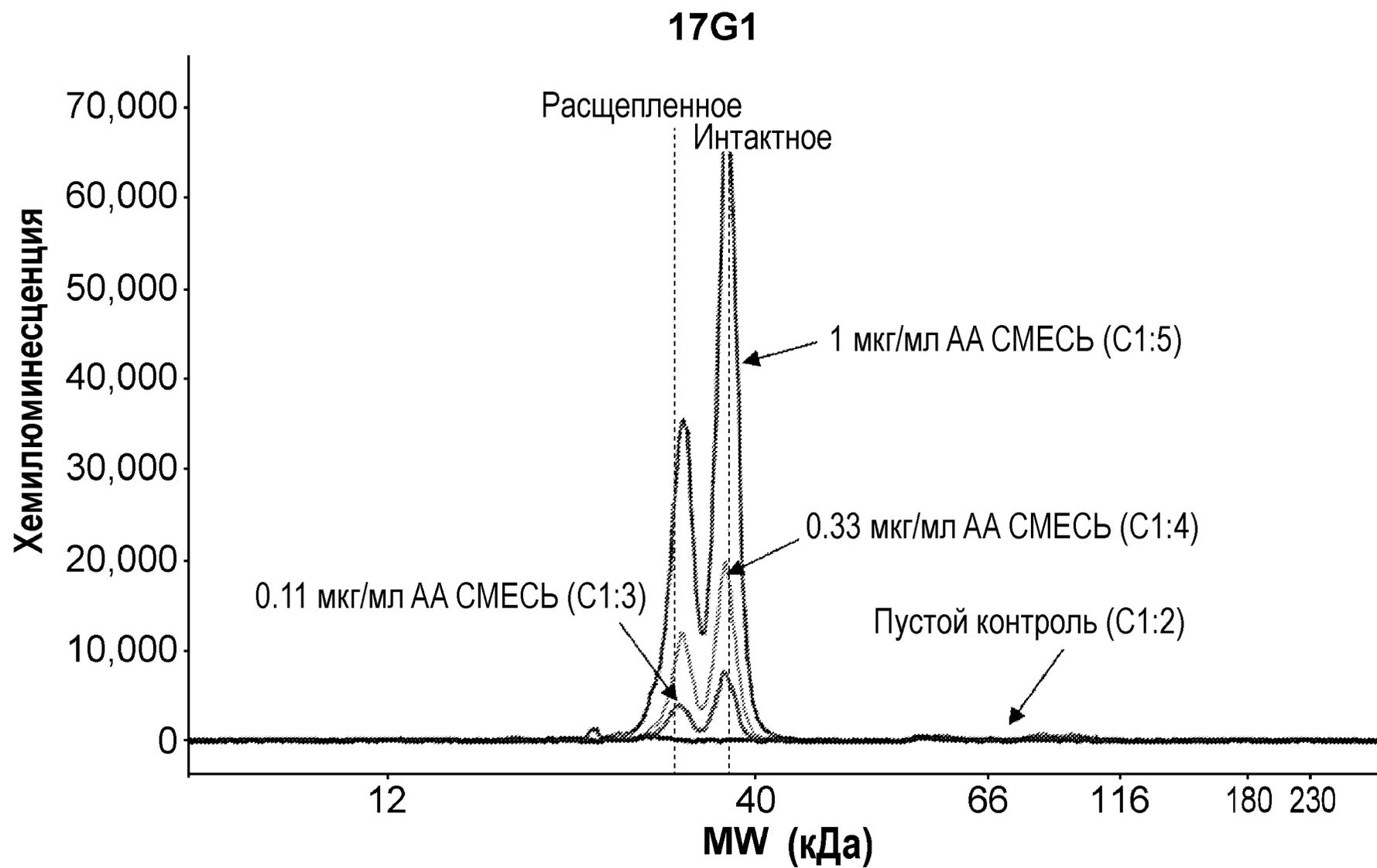
ФИГ.1В



ФИГ.2

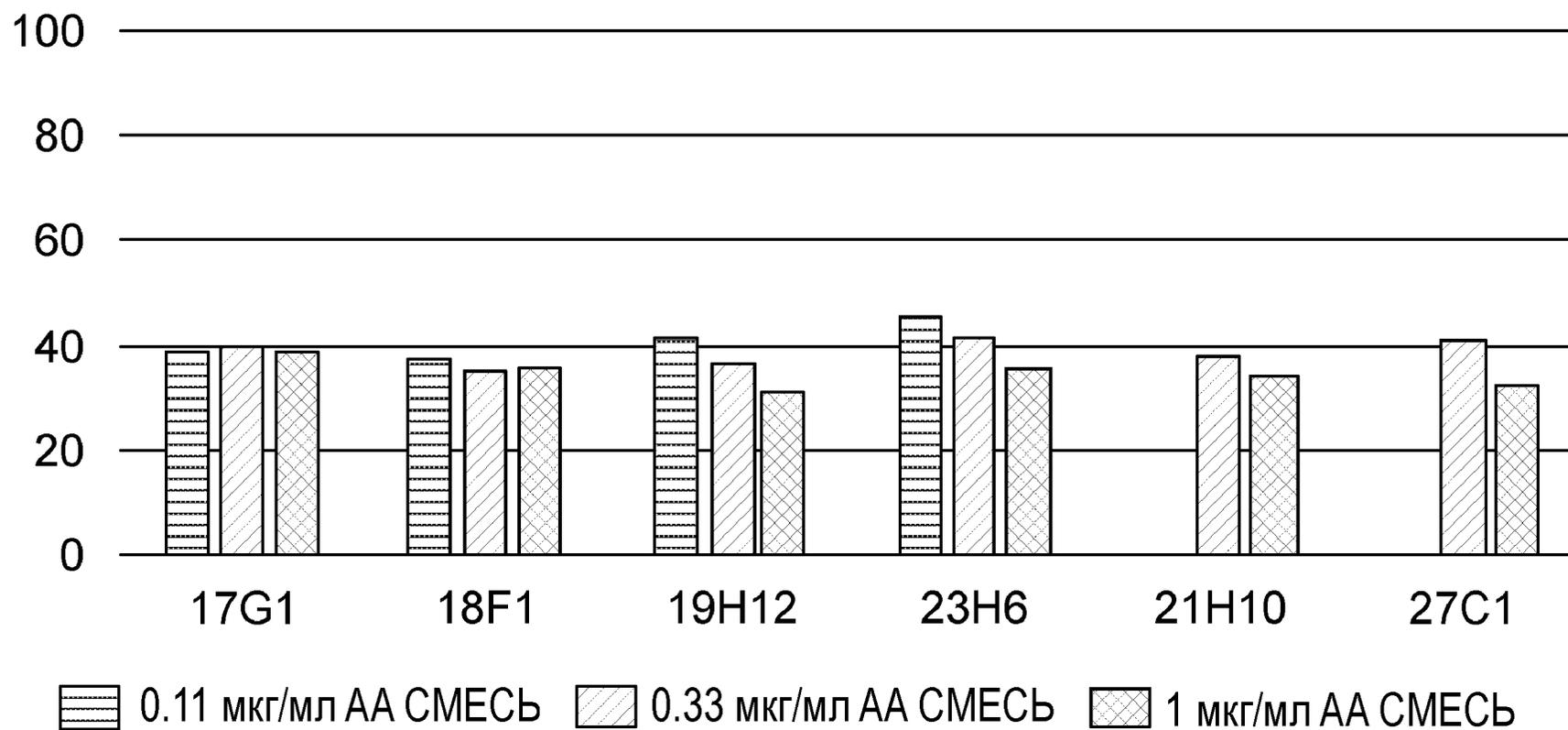


ФИГ.3А

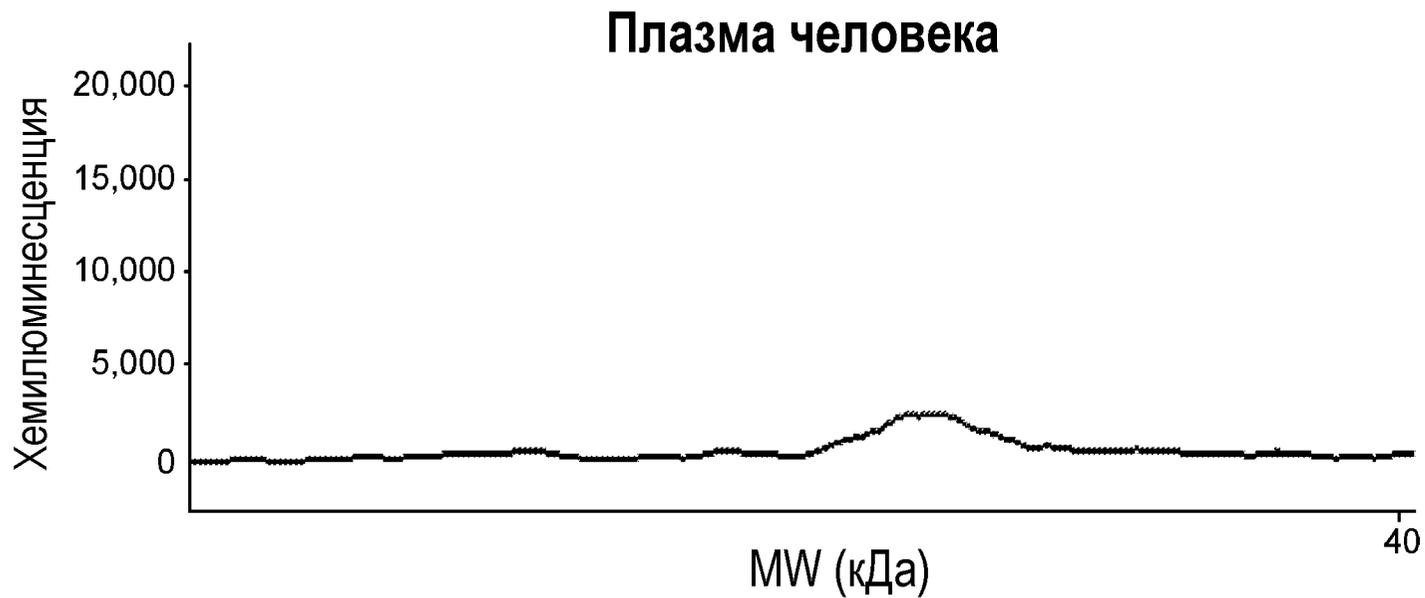


ФИГ.3В

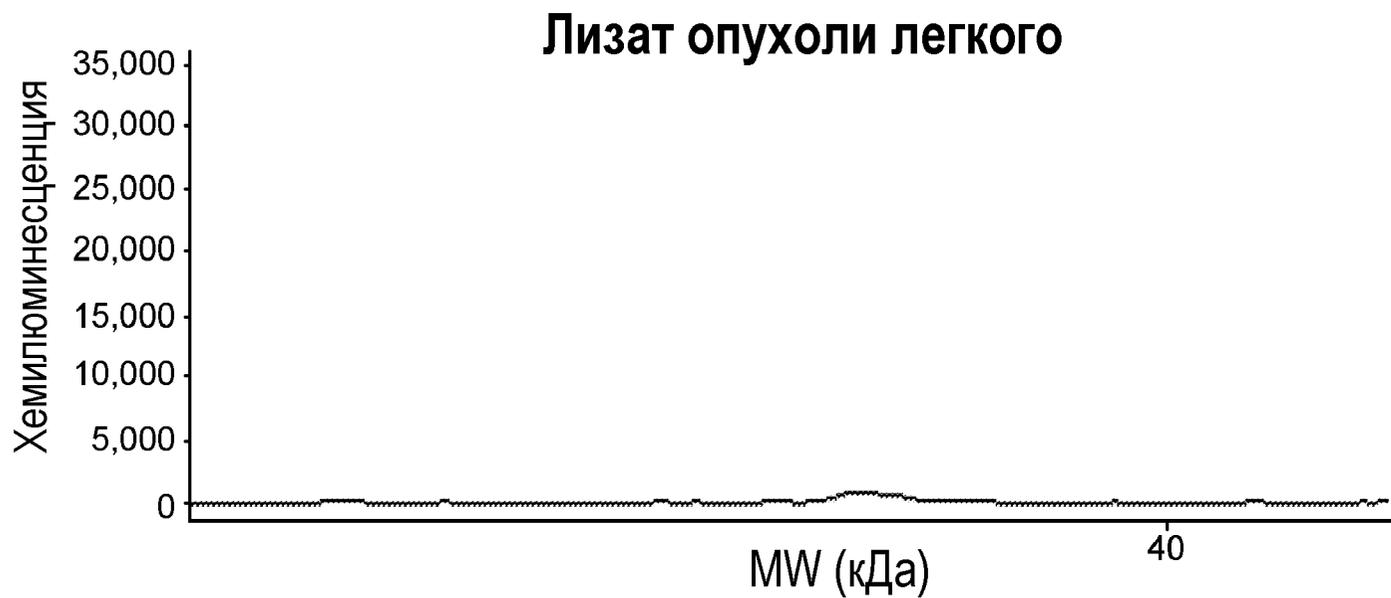
% Расщепленного Ат в плазме человека 1:100



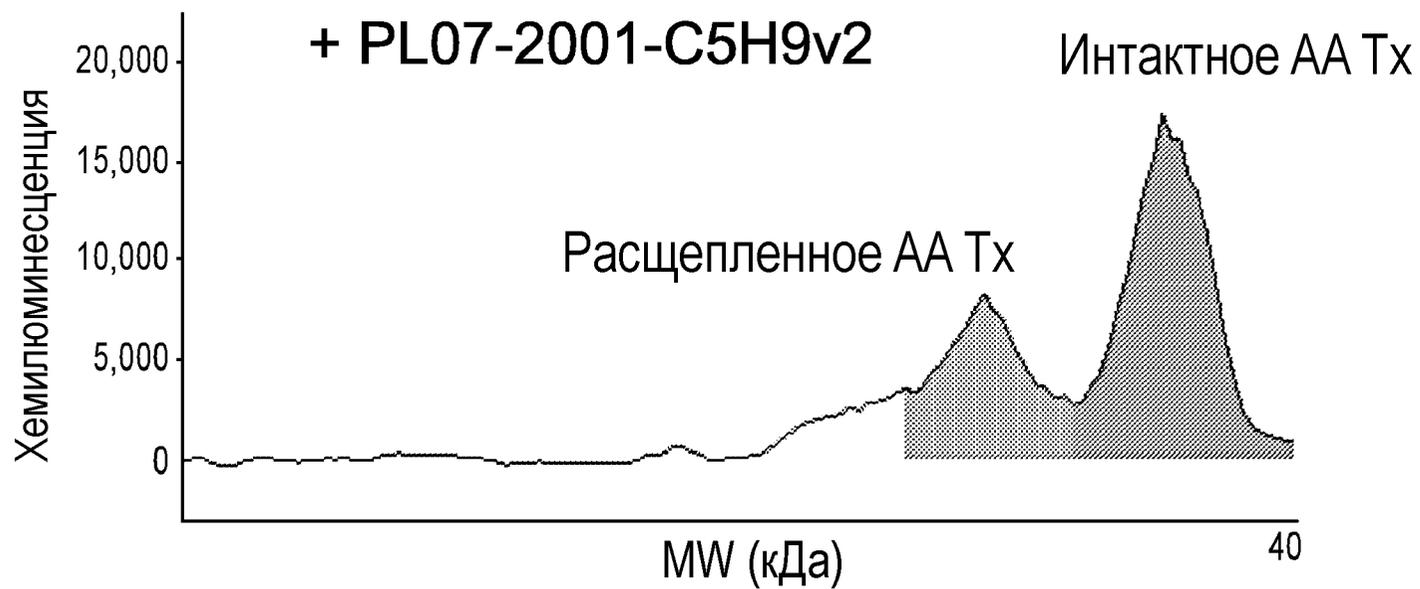
ФИГ.4А



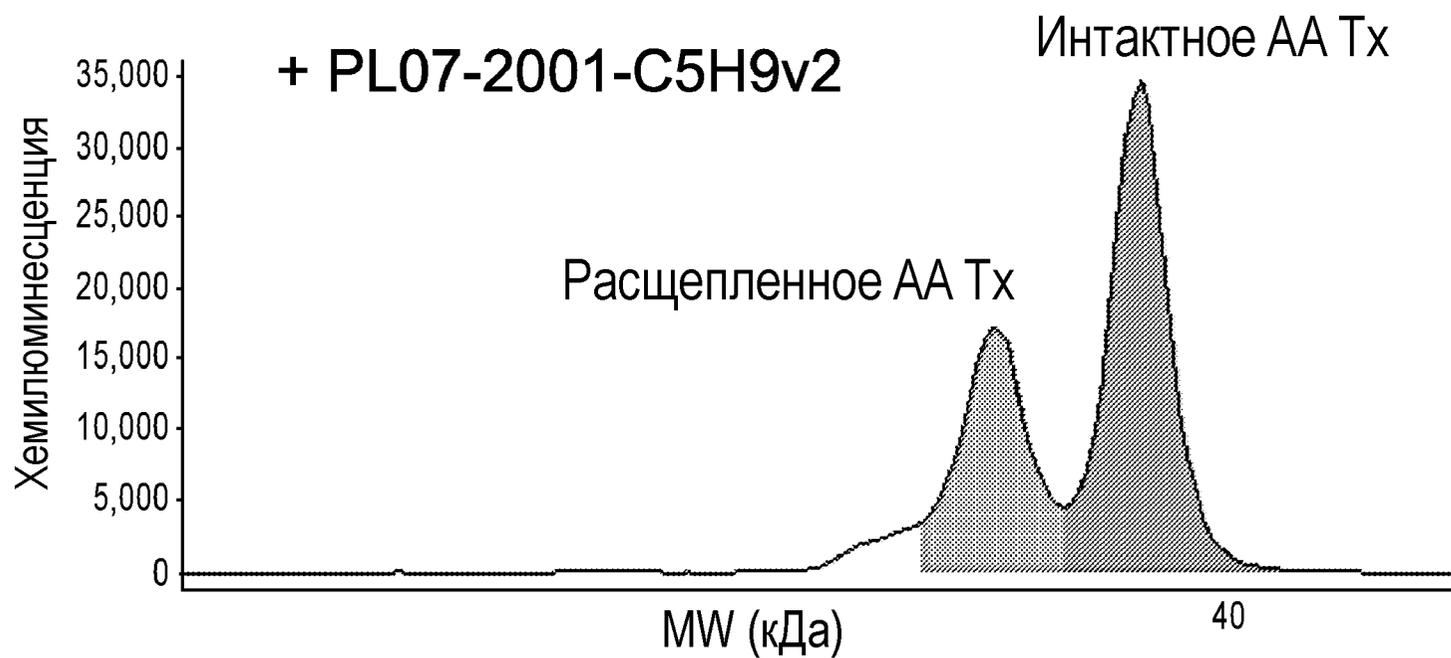
ФИГ.4В



ФИГ.4С



ФИГ.4D

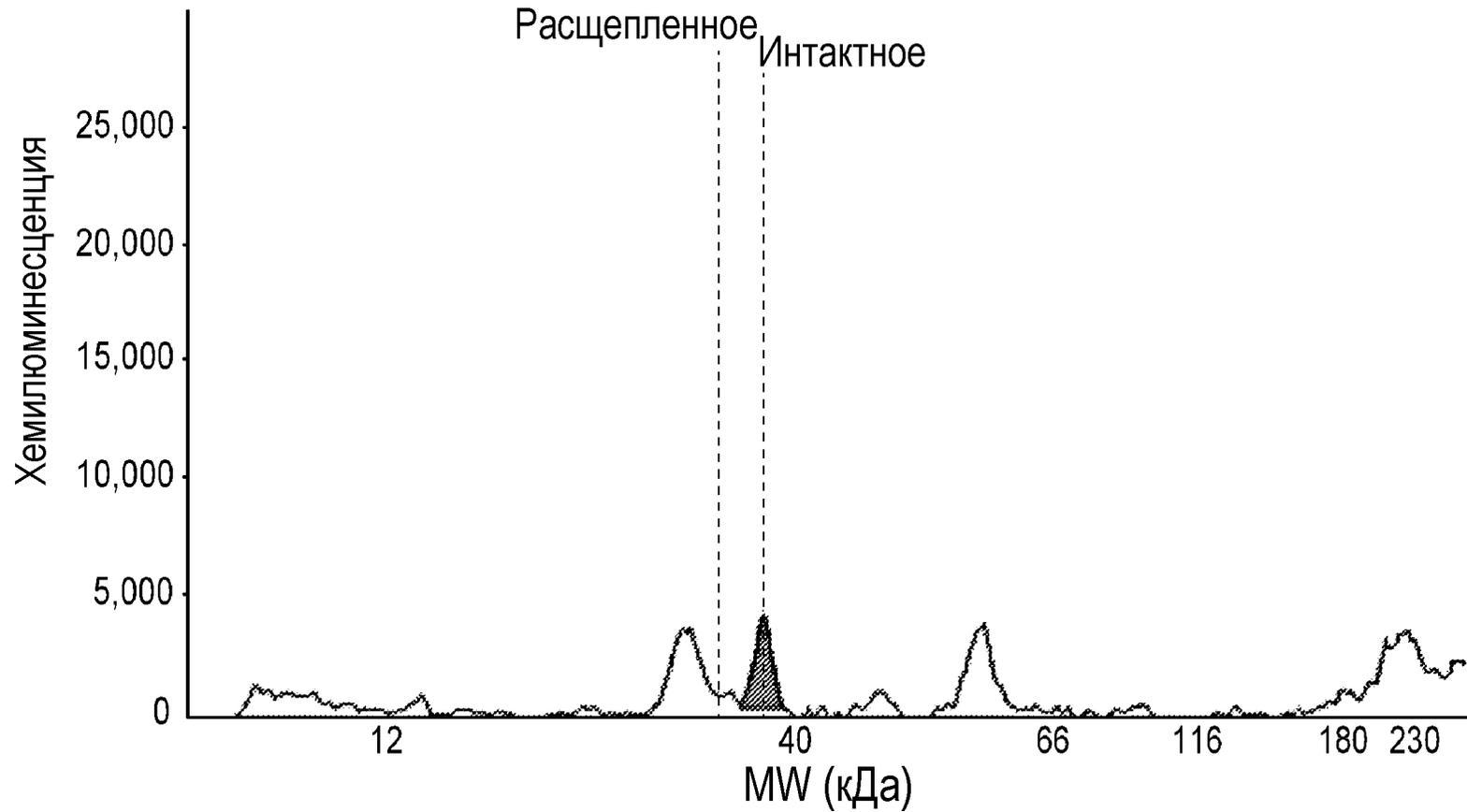


ФИГ.5А

Обнаружение коммерческим антителом к IgG человека

Плазма мыши, получавшей 10 мг/кг PL07-2001-C5H9V2

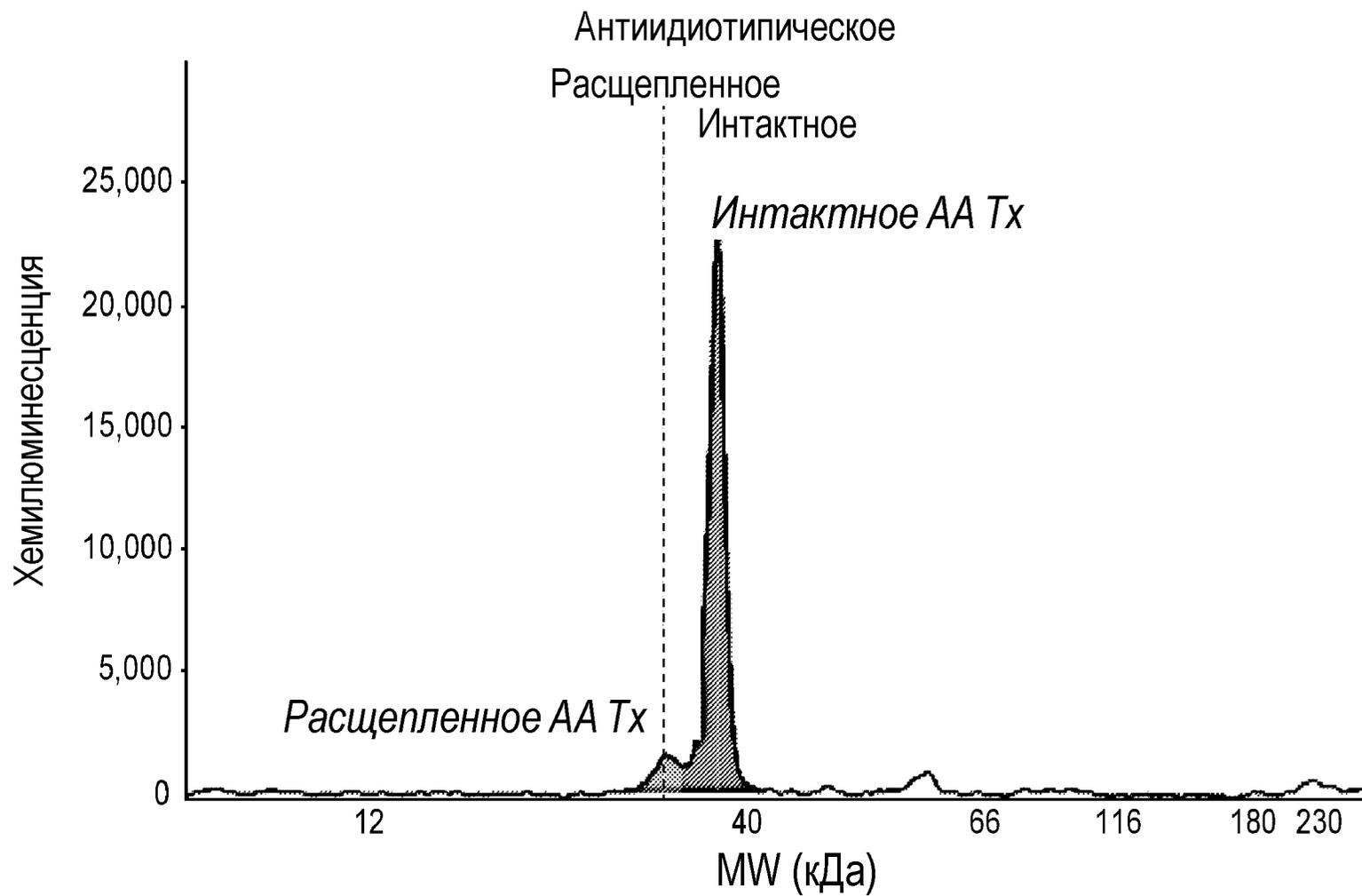
Антитело к IgG человека, адсорбированное на иммуноглобулине циномоглуса



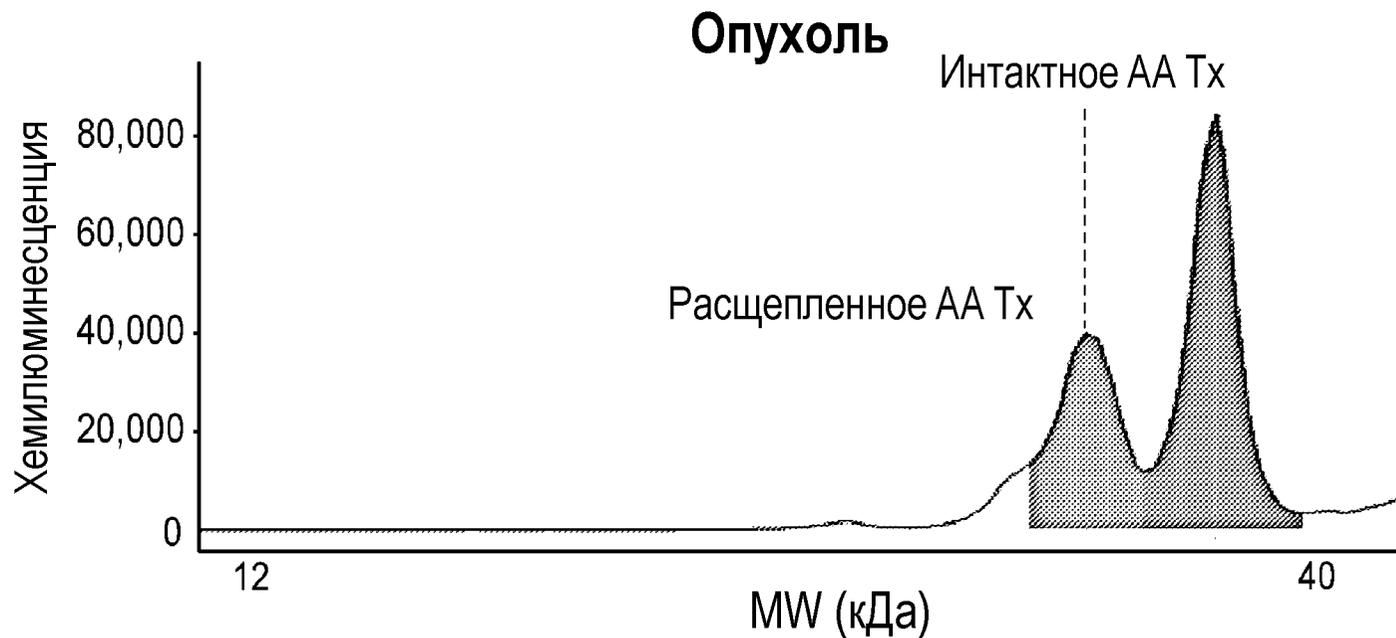
ФИГ.5В

Обнаружение антиидиотипическим Ат

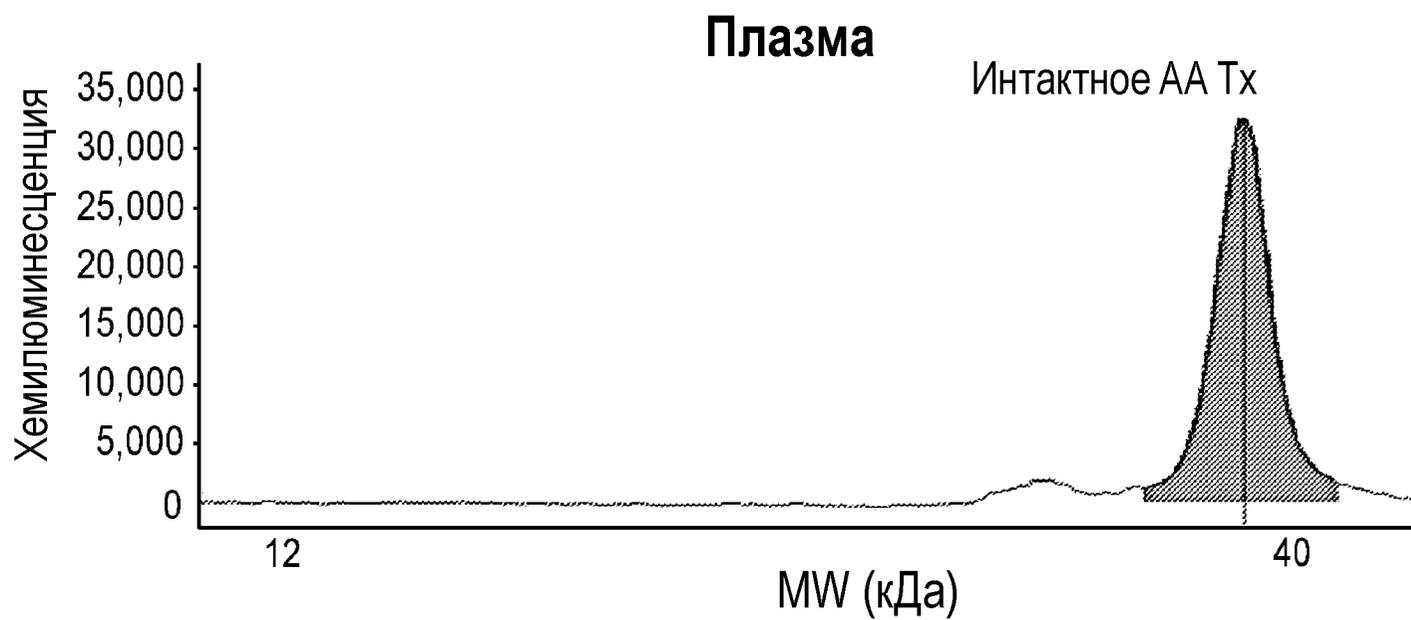
Плазма мыши, получавшей 0.1 мг/кг PL07-2001-C5H9V2



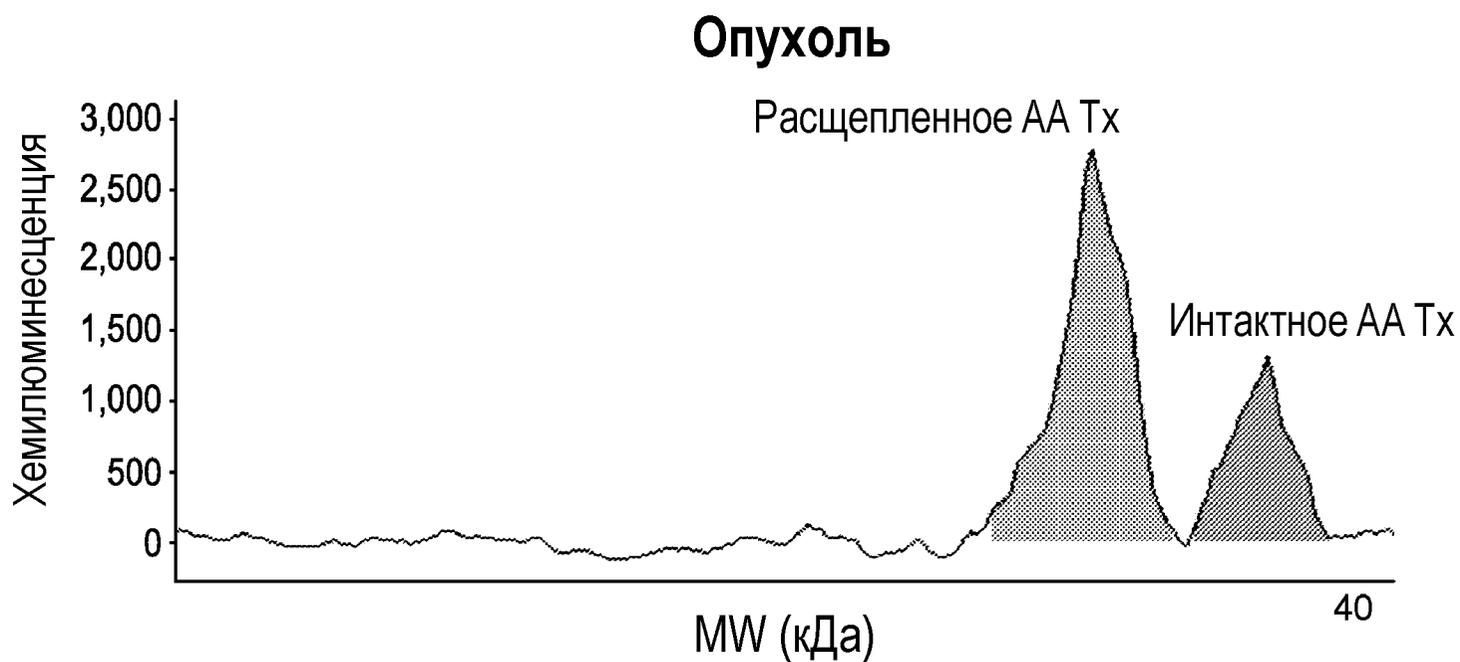
ФИГ.6А



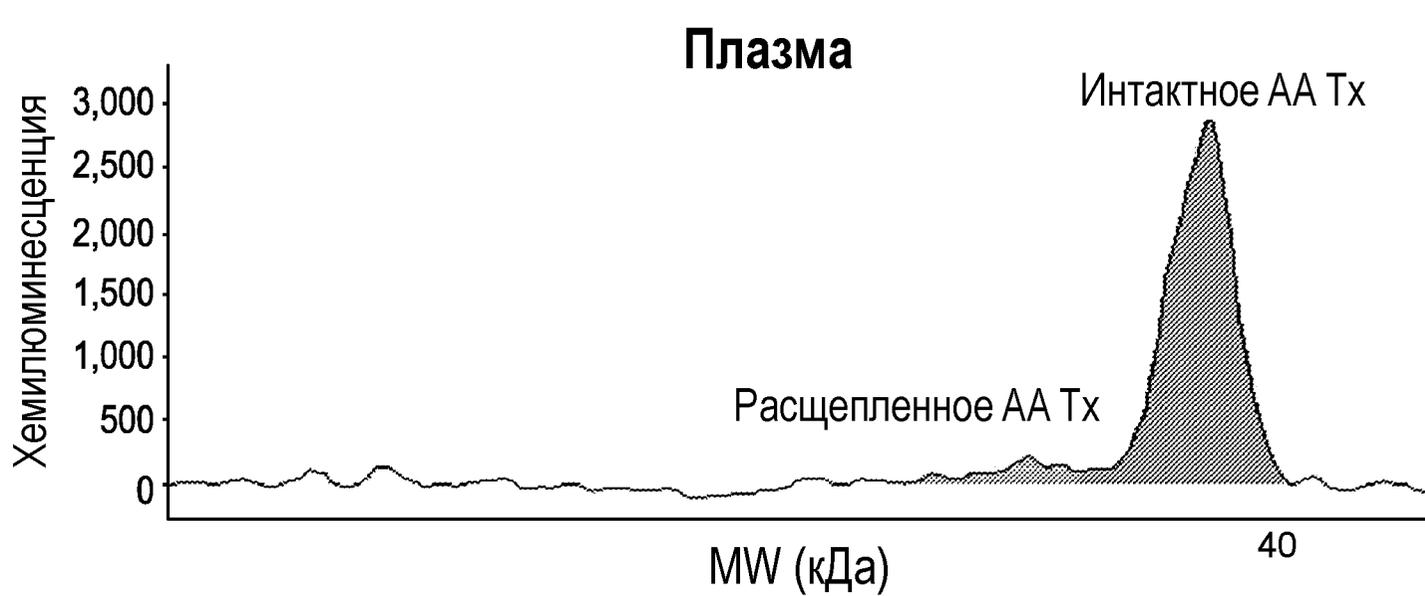
ФИГ.6В



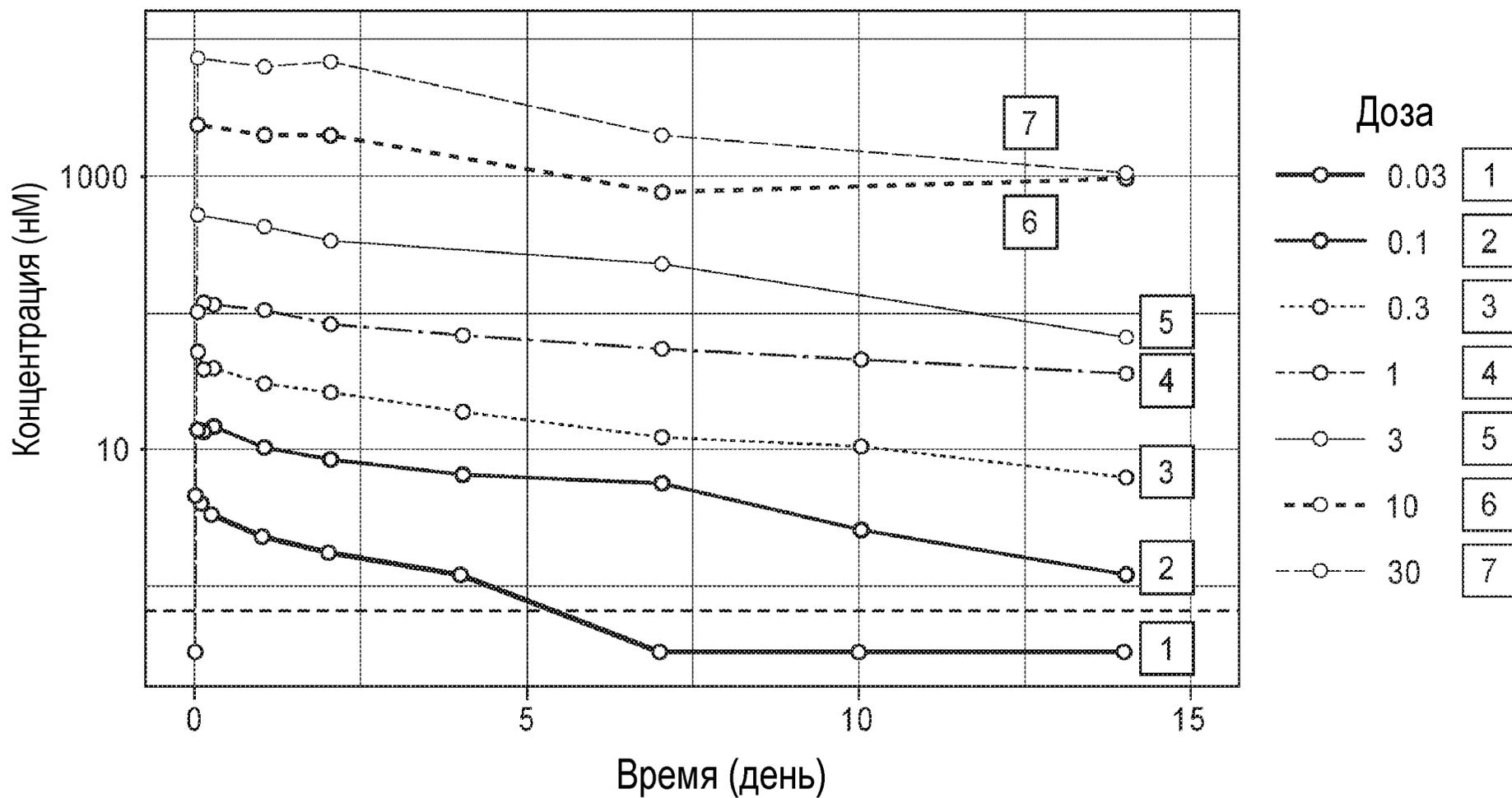
ФИГ.7А



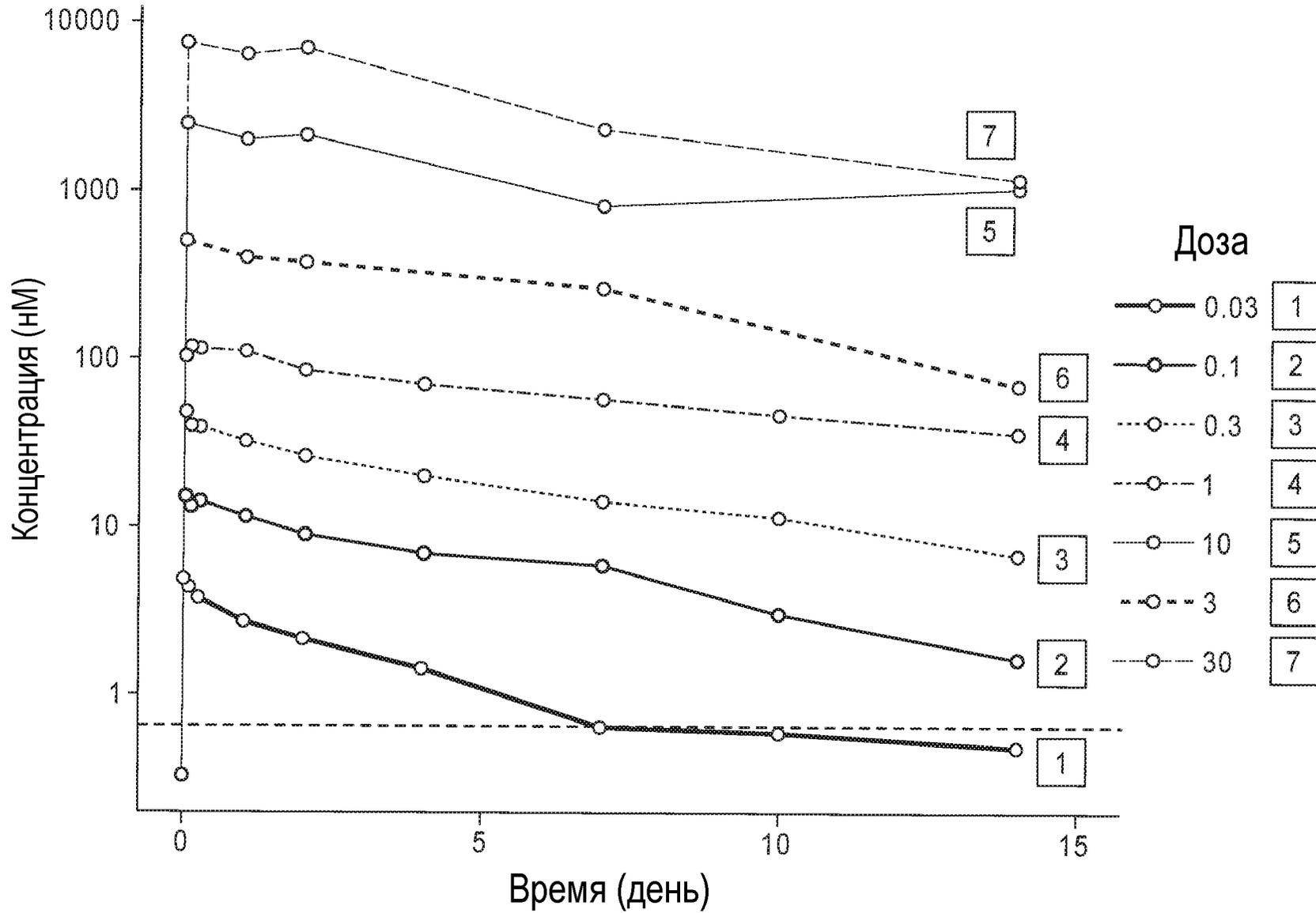
ФИГ.7В



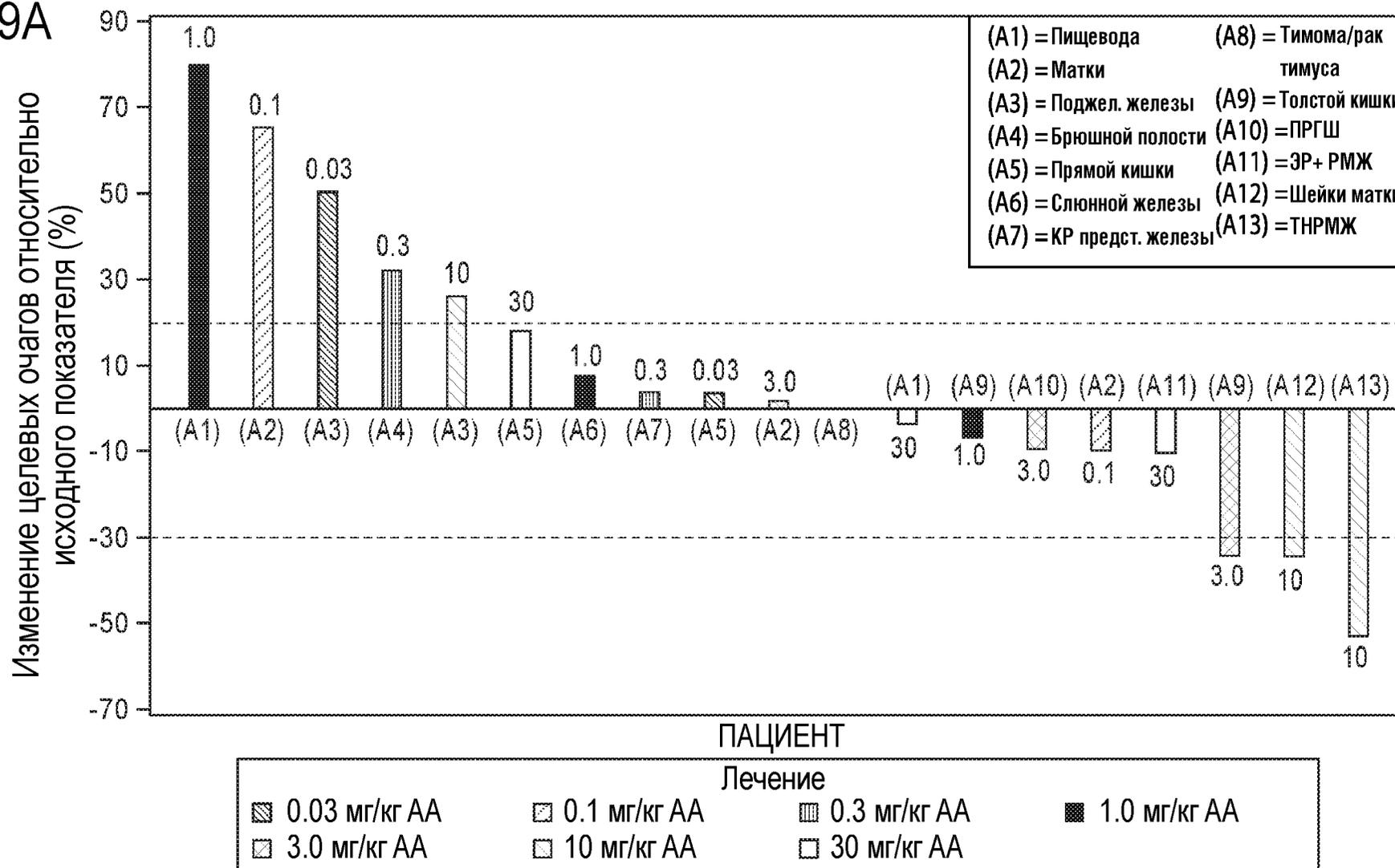
ФИГ.8А



ФИГ.8В



ФИГ.9А

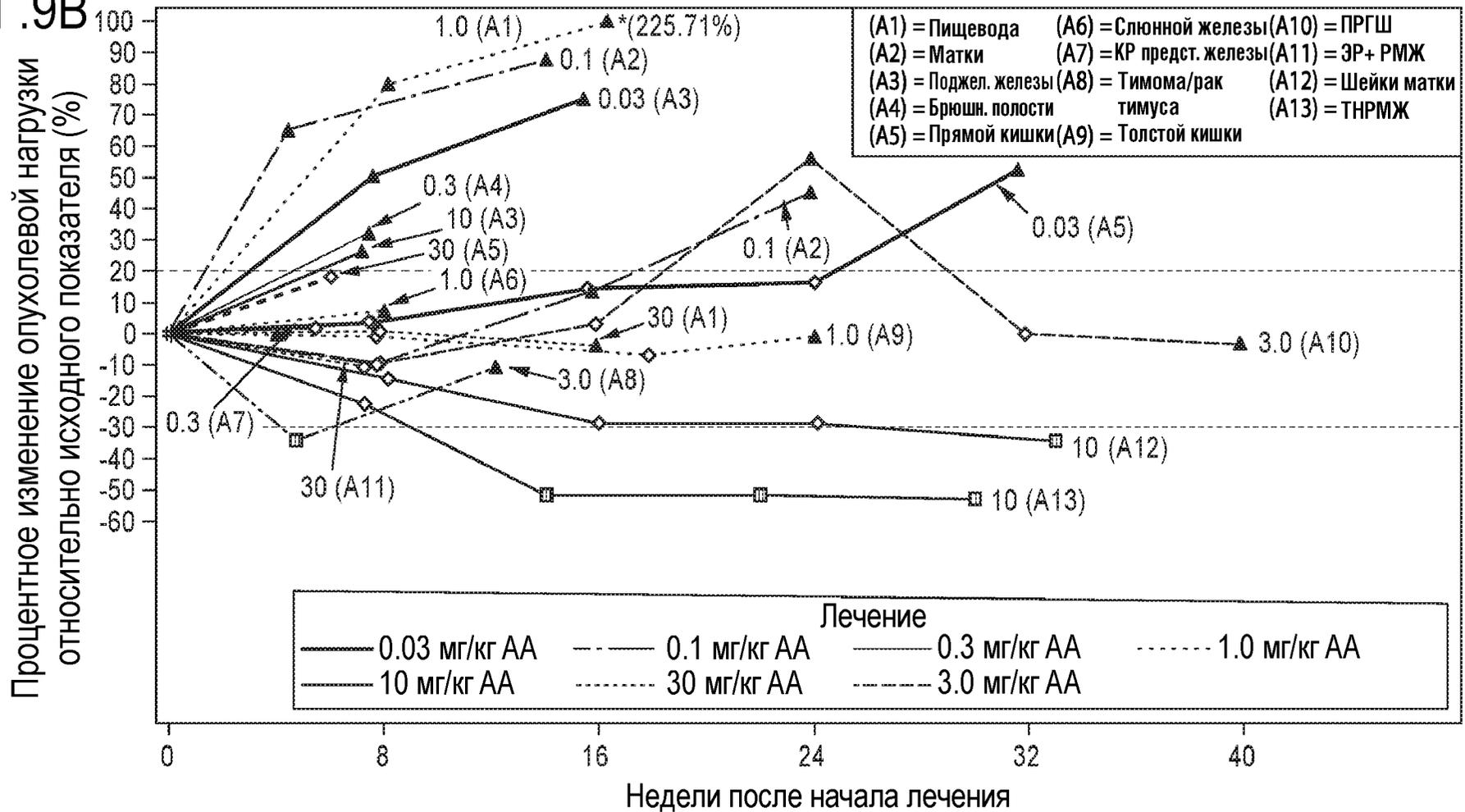


14/17

AA = PL07-2001-C5H9v2

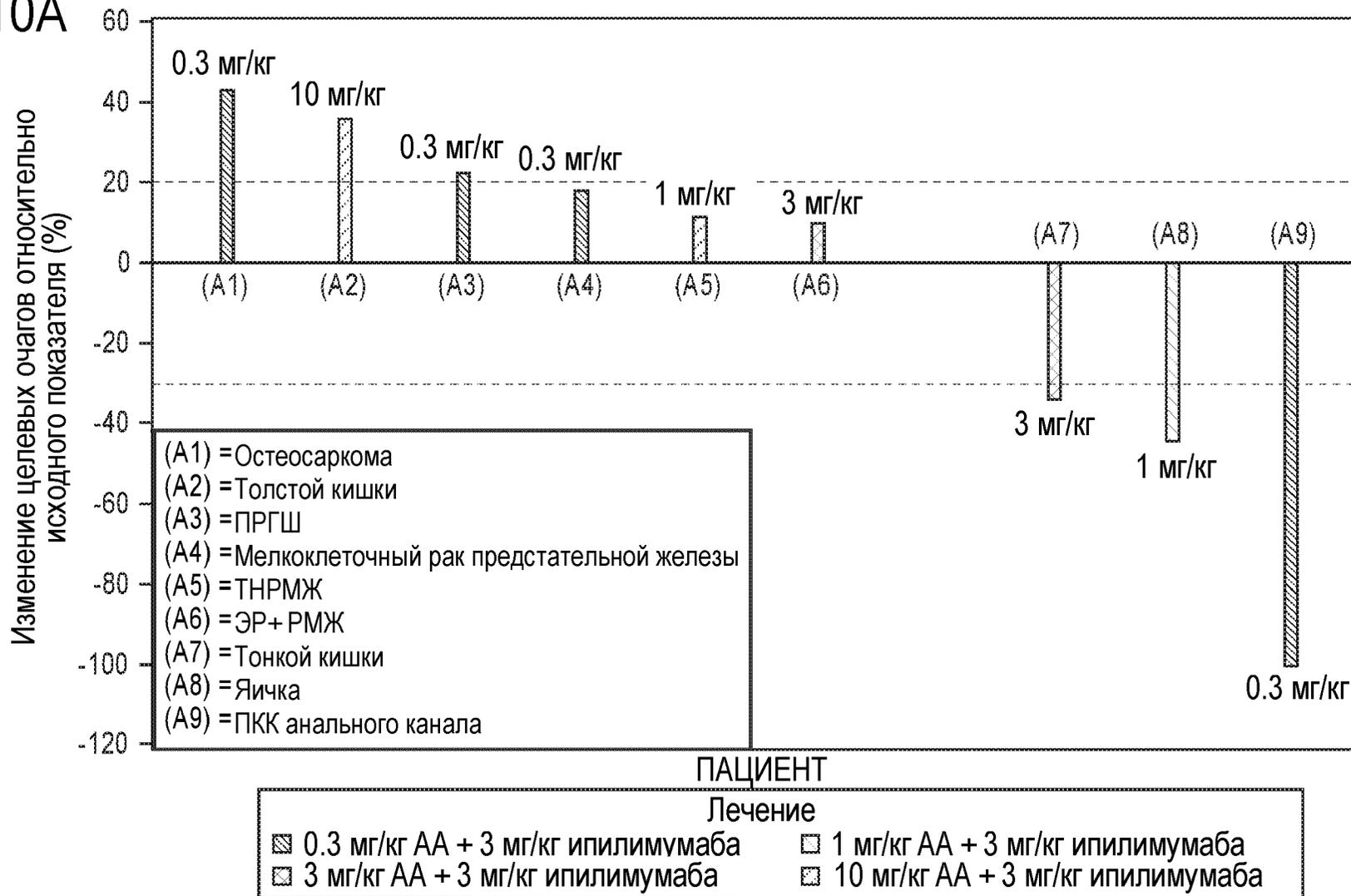
КР, кастрационно-резистентный; ЭР+ РМЖ, эстроген-рецептор-положительный рак молочной железы; ПРГШ, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; PD, прогрессирующее заболевание; PR, частичный объективный ответ; RECIST, Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях; SD, стабилизация заболевания; ТНРМЖ, трижды негативный рак молочной железы

ФИГ. 9В



КР, кастрационно-резистентный; ЭР+ РМЖ, эстроген-рецептор-положительный рак молочной железы; ПРГШ, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; PD, прогрессирующее заболевание; PR, частичный объективный ответ; RECIST, Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях; SD, стабилизация заболевания; ТНРМЖ, трижды негативный рак молочной железы

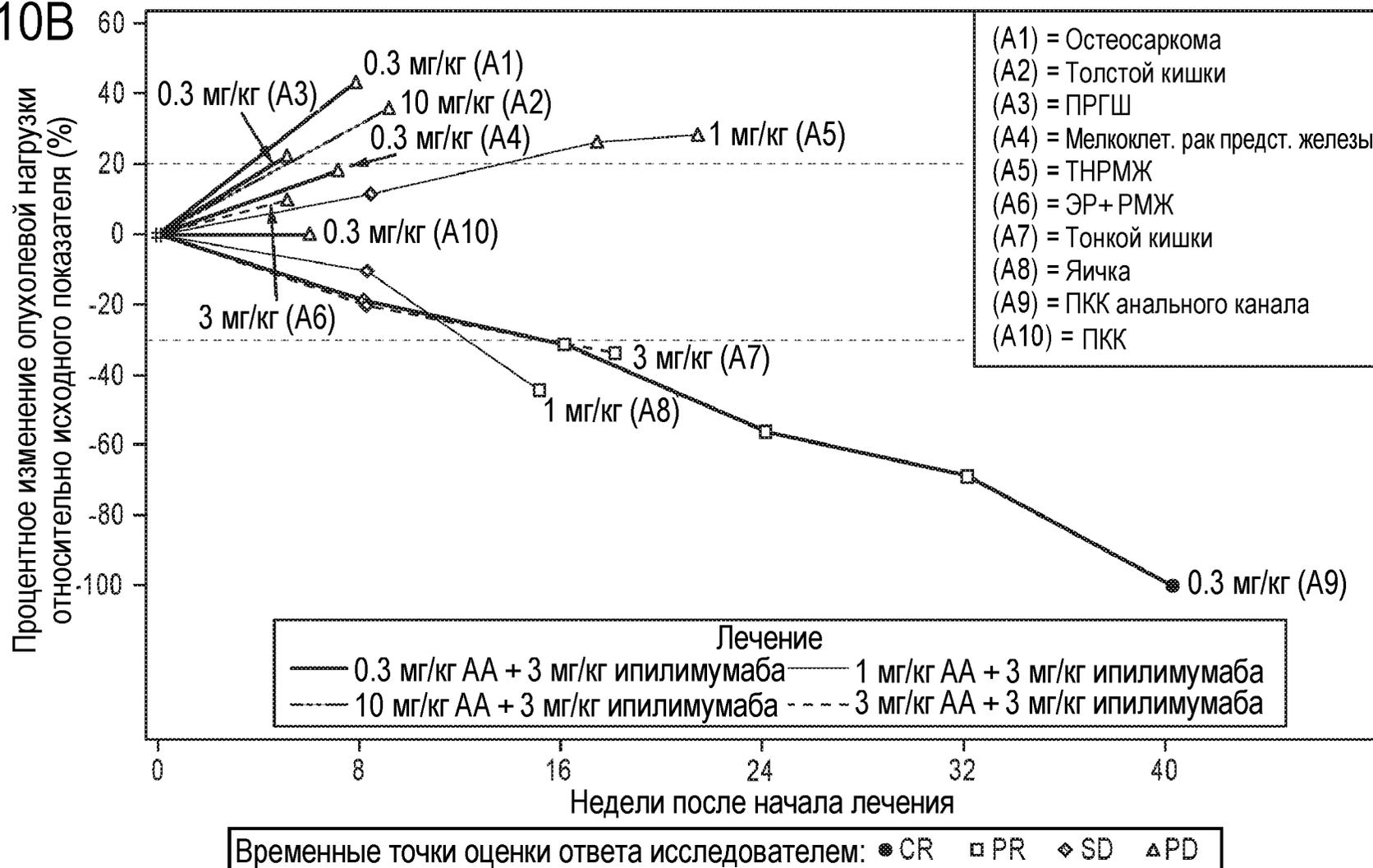
ФИГ.10А



AA = PL07-2001-C5H9v2

CR, полный объективный ответ; ЭР+ РМЖ, эстроген-рецептор-положительный рак молочной железы; ПРГШ, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; PD, прогрессирующее заболевание; PR, частичный объективный ответ, RECIST, Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях; ПКК, плоскоклеточная карцинома; МККЛ, мелкоклеточная карцинома легкого; SD, стабилизация заболевания; ТНРМЖ, трижды негативный рак молочной железы

ФИГ.10В



CR, полный объективный ответ; ЭР+РМЖ, эстроген-рецептор-положительный рак молочной железы; ПРГШ, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; PD, прогрессирующее заболевание; PR, частичный объективный ответ, RECIST, Критерии оценки объективного ответа при солидных опухолях; ПКК, плоскоклеточная карцинома; МККЛ, мелкоклеточная карцинома легкого; SD, стабилизация заболевания; ТНРМЖ, трижды негативный рак молочной железы