(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190653 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.26

(22) Дата подачи заявки
2019.10.11

(51) Int. Cl. ***A61K 47/68*** (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЪЮГАТЫ СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С ТОКСИНОМ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТРАЦИКЛИНЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНООНКОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

(31) **18199879.0**
(32) **2018.10.11**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2019/077644**
(87) **WO 2020/074724 2020.04.16**

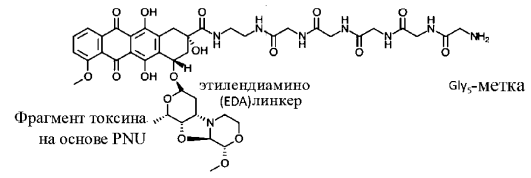
(71) Заявитель:
ЭнБиИ - ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Гравундер Ульф, Берли Роджер, Вальдмайер Лоренц, Претто Франческа (CH)

(74) Представитель:
Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В., Стукалова В.В., Ясинский С.Я. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгатам связывающего белка с токсином, содержащим один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, и их применению в иммуноонкологических целях.

G5-EDA-PNU



202190653 A1

202190653 A1

КОНЪЮГАТЫ СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С ТОКСИНОМ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТРАЦИКЛИНЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНООНКОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к конъюгатам связывающего белка с токсином, содержащим один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, и их применению в иммуноонкологических целях.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Конъюгаты связывающего белка с токсином, наиболее яркими представителями которых являются конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC), оказали огромное влияние на терапию рака, предоставив новые терапевтические подходы к типам опухолей, которые до сих пор не поддавались лечению.

С другой стороны, открытие контрольных точек иммунного ответа и разработка ингибиторов иммунных контрольных точек снова привлекло внимание к роли иммунной системы в терапии рака и способам стимулирования иммунной системы или преодоления иммунных контрольных точек, которые соответствующие опухоли используют для самозащиты от атак иммунной системы.

Хотя оба подхода обсуждались с большим энтузиазмом и продемонстрировали значительный прогресс в лечении рака, также стало ясно, что существуют типы опухолей, которые нельзя лечить с помощью этих новых подходов.

Например, было показано, что ADC с определенными токсинами не активны против определенных типов рака, хотя они направлены с помощью своего антитела на специфический для рака антиген. Также было показано, что существуют типы опухолей, в которых ингибиторы иммунных контрольных точек не действуют.

Следовательно, одна цель настоящего изобретения – предоставить новые подходы, которые позволяют лечить типы опухолей, которые до сих пор не могли быть устранены с помощью существующих методов лечения.

Еще одна цель настоящего изобретения – предоставить виды комбинированной терапии, которые увеличивают противоопухолевую активность соответствующих видов монотерапии.

Эти и другие цели решаются с помощью способов и средств согласно независимым пунктам формулы настоящего изобретения. Зависимые пункты формулы относятся к конкретным вариантам осуществления.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к конъюгатам связывающего белка с токсином, содержащим один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, и их применению в иммуноонкологических целях. Настоящее изобретение и общие преимущества его признаков будут подробно обсуждаться ниже.

Описание фигур

Фигура 1. Химические структуры модифицированного пентаглицином производного EDA-антрациклина PNU-159682 (G5-EDA-PNU или G5-PNU), используемого для создания сайт-специфически конъюгированных ADC, используемых в экспериментах согласно настоящему изобретению. G3-PNU и G2-PNU относятся к одним и тем же структурам, но в которых пентаглицин заменен триглицином или диглицином соответственно.

Фигура 2. FACS-анализ экспрессии ROR1 человека, стабильно экспрессируемого на клетках рака молочной железы мыши EMT-6. Клон 14 EMT-6-ROR1, выбранный для исследований *in vivo*, был проанализирован с помощью окрашивания FACS в отношении экспрессии ROR1 с помощью флуоресцентно меченного клона 2A2 антитела к ROR1. Отрицательный контроль показывает окрашивание тех же клеток флуоресцентно меченным совпадающим по изотипу контрольным антителом.

Фигура 3. Подбор дозы нового анти-ROR1 PNU-ADC, основанного на антителе XBR1-402, с однократным лечением при различных уровнях дозы (0,25, 0,5 и 1 мг/кг) на ортотопической модели сингенного рака молочной железы EMT-6-ROR1 (клон 14). (A) Рост опухолей ортотопически трансплантированных опухолей молочной железы отслеживают в различных группах лечения с течением времени, как указано. (B) Кривые роста опухоли у отдельных мышей из групп, представленных на панели (A).

Фигура 4. Динамика изменения объема опухоли у сингенных мышей с ортотопически трансплантированными клетками рака молочной железы EMT-6-ROR1 (клон 14) либо (A) с помощью инъекцией контроля носителем (PBS), либо с помощью (B) однократного введения 0,25 мг/кг совпадающего по изотипу контрольного PNU-ADC, содержащего антитело к CD30 брентуксимаб, клон Ac10, или (C) однократного введения 0,25 мг/кг анти-ROR1 PNU-ADC, содержащего новое антитело к ROR1 XBR1-402, что

согласно фигуре 3 было определено как субоптимальная доза для лечения ортотопических опухолей молочной железы EMT-6-ROR1 у мышей. На панелях (D) и (E) показано комбинированное лечение с помощью антитела 9D9 к CTLA4, ингибитора контрольной точки иммунитета, с 0,25 мг/кг совпадающего по изотипу контрольного ADC Ac10 и 0,25 мг/кг нового анти-ROR1 PNU ADC, как указано. (F) Динамика изменения медианного объема опухоли в группе (с применением методологии переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF)) для следующих групп: контроль носителем, изотипический контроль Ac10-G5-PNU и XBR1-402-G5-PNU, (G) Динамика изменения медианного объема опухоли в группе (с применением методологии переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF)) для следующих групп: контроль носителем, изотипический контроль Ac10-G5-PNU и антитело 9D9 к CTLA-4 мыши, а также XBR1- 402-G5-PNU и антитело 9D9 к CTLA-4 мыши.

Фигура 5. FACS-анализ экспрессии ROR1 человека, стабильно экспрессируемого на (A) клетках рака молочной железы мыши CT-26 (клон 3) и (B) клетках рака меланомы мыши B16 (пул). Пулы клона 3 CT-26-ROR1 и пулы B16-ROR1, выбранные для исследований *in vivo*, были проанализированы с помощью окрашивания FACS в отношении экспрессии ROR1 с помощью флуоресцентно меченного клона XBR1-402 антитела к ROR1 (правый пик). Отрицательный контроль показывает окрашивание тех же клеток флуоресцентно меченным совпадающим по изотипу контрольным антителом (левый пик).

Фигура 6. Динамика изменения объема опухоли у мышей, которым трансплантировали опухолевые клетки клона 3 CT-26-ROR1 согласно примеру 6: (A) контроль носителем (без лечения) из группы 1, (B) изотипический контроль из группы 2, (C) анти-ROR1 ADC huXBR1-402-17 из группы 3, (D) изотипический контроль вместе с ингибитором иммунных контрольных точек, антителом к PD-1 мыши из группы 4, (E) анти-ROR1 ADC huXBR1-402-17 вместе с ингибитором иммунных контрольных точек, антителом к PD-1 мыши из группы 7. На вставках на панелях A-E указано количество мышей, у которых был предотвращен рост опухоли, по отношению к количеству мышей в каждой группе лечения. Результаты позволяют предположить взаимодействие между оцениваемым ингибитором иммунных контрольных точек и нацеленным ADC, содержащим производное PNU.

Фигура 7. Объемы колоний на поверхности легких у мышей после внутривенного применение пулов B16 с избыточной экспрессией ROR1, как в примере 7, после обработки контролем-носителем («носитель», группа 1), антителом к CTLA-4 мыши - ингибитором иммунных контрольных точек («CTLA-4», группа 2), анти-ROR1 ADC huXBR1-402-17 («ADC», группа 3) и анти-ROR1 ADC huXBR1-402-17 вместе с антителом к CTLA-4 мыши,

ингибитором иммунных контрольных точек («ADC + CTLA-4», группа 4). Эти результаты свидетельствуют о сильном синергизме между оцениваемым ингибитором иммунных контрольных точек и нацеленным ADC, содержащим производное PNU, в случае слабо иммуногенной опухоли. «n.s.» означает отсутствие статистически значимого различия, «*» обозначает статистически значимое различие.

Фигура 8. CD4- и CD8-окрашивание криосрезов опухоли B16, избыточно экспрессирующей hROR1 (ROR1 человека), от (A) не получившей лечение контрольной мыши и (B) трех мышей, получавших ADC (однократно, в дозе 4 мг/кг) согласно настоящему изобретению. Как показано на фигуре 8(A), опухоли B16 естественным образом содержат низкие уровни клеток CD4+ и CD8+, что соответствует статусу опухолей B16 как «холодных» опухолей. На фигуре 8(B) показано, что лечение с помощью ADC согласно настоящему изобретению увеличивает количество клеток CD4+ и CD8+ в опухоли.

Фигура 9. Анализ окрашивания 41BB (CD137), маркера активации Т-клеток, на инфильтрирующих лимфоцитах в опухолях CT-26 и B-16, избыточно экспрессирующих hROR1 (ROR1 человека). Как показано на фигуре 9, в опухолях B-16 можно наблюдать значительно меньшее количество активированных Т CD4+ (A) и CD8+ (B) лимфоцитов по сравнению с опухолями CT-26, что соответствует статусу опухолей B-16 как «холодных» опухолей. «*» указывает на статистически значимое различие.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед подробным описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными составными частями описанных устройств или стадиями процесса описанных способов, поскольку такие устройства и способы могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что, как используется в описании и прилагаемой формуле настоящего изобретения, формы единственного числа включают в себя единственное и/или множественное число, если контекст явно не диктует иное. Кроме того, следует понимать, что в случае, если даны диапазоны параметров, которые ограничены числовыми значениями, считается, что диапазоны включают в себя эти ограничивающие значения.

Кроме того, следует понимать, что варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, не следует понимать как отдельные варианты осуществления, которые не связаны друг с другом. Признаки, обсуждаемые в одном варианте

осуществления, должны быть раскрыты также в связи с другими вариантами осуществления, показанными в настоящем документе. Если в одном случае конкретный признак раскрывается не в одном варианте осуществления, а в другом, квалифицированному специалисту будет понятно, что это не обязательно означает, что указанный признак не предназначен для раскрытия с указанным другим вариантом осуществления. Квалифицированному специалисту будет понятно, что суть настоящей заявки состоит в том, чтобы раскрыть упомянутый признак также для другого варианта осуществления, но что просто для ясности и для сохранения настоящего описания в объеме, не выходящем за разумные рамки, это не было сделано.

Кроме того, содержание документов предшествующего уровня техники, упомянутых в настоящем документе, включено посредством ссылки. Это относится, в частности, к документам предшествующего уровня техники, в которых раскрыты стандартные или рутинные способы. В этом случае включение посредством ссылки имеет в основном цель обеспечить достаточное раскрытие и избежать длинных повторений.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком (для производства лекарственного средства), для лечения пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

Важно подчеркнуть, что приведенная выше формулировка с термином «для производства лекарственного средства» в скобках была выбрана для соответствия различным национальным/региональным требованиям в отношении формулы изобретения, охватывающей медицинские применения данных соединений. В частности, формулировка должна охватывать как так называемый формат швейцарского типа (где требуется квалификатор «для производства лекарственного средства»), так и соответствующую формулировку формулы в соответствии с EPC2000 (где один и тот же классификатор больше не допускается).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ лечения или профилактики неопластического заболевания, характеризуемого как «холодная» опухоль, причем указанный способ предусматривает введение пациенту конъюгата связывающего белка с токсином, содержащего один или несколько фрагментов антрациклинового токсина.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрена комбинация следующего:

(i) конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, и

(ii) ингибитор иммунных контрольных точек,

предусмотрена (для производства лекарственного средства) для лечения пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль,

причем конъюгат связывающего белка с токсином и ингибитор иммунных контрольных точек вводят пациенту одновременно или последовательно, в любом порядке.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ лечения или профилактики неопластического заболевания, характеризуемого как «холодная» опухоль, причем указанный способ предусматривает введение пациенту следующего:

(i) конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, и

(ii) ингибитор иммунных контрольных точек,

причем конъюгат связывающего белка с токсином и ингибитор иммунных контрольных точек вводят пациенту одновременно или последовательно, в любом порядке.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, для применения в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек (для производства лекарственного средства) для применения при лечении пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен ингибитор иммунных контрольных точек для применения в комбинации с конъюгатом связывающего белка с токсином, содержащим один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, (для производства лекарственного средства) для применения при лечении пациента

- страдающего от,

- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

Согласно одному варианту осуществления ингибитор иммунных контрольных точек модулирует положительный белок иммунной контрольной точки. Согласно другому варианту осуществления ингибитор иммунных контрольных точек модулирует отрицательный белок иммунной контрольной точки.

Согласно одному варианту осуществления конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, вводят перед ингибитором иммунных контрольных точек.

Согласно одному варианту осуществления пациент

- страдает от, и/или
- у него диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

«Горячая опухоль» означает злокачественную или неопластическую ткань, которая характеризуется инфильтрацией иммунных клеток. Уровень иммунной инфильтрации отражает то, распознает ли иммунная система опухоль и задействована ли она в опухоли. Термин «горячая опухоль» используется в настоящем документе как синоним термина «иммунологически чувствительная опухоль». Альтернативно, «горячие опухоли» можно определить как опухоли, которые отвечают на лечение ингибиторами иммунных контрольных точек.

Используемый в настоящем документе термин «ответ на лечение» означает статистически значимое снижение опухолевой нагрузки или роста опухоли по сравнению с лечением сравнимым носителем или изотипическим контролем.

Согласно одному варианту осуществления термин «холодная опухоль» означает злокачественную или неопластическую ткань, которая характеризуется плохой инфильтрацией иммунных клеток или отсутствием такой инфильтрации. Термин «холодная опухоль» используется в настоящем документе как синоним термина «иммунологически нечувствительная опухоль».

Одним из критериев определения опухоли как «холодной» является так называемое значение Immunoscore, основанное на плотности двух типов Т-клеток в образце опухоли. Одним из примеров является плотность двух популяций лимфоцитов (CD3/CD45RO, CD3/CD8 или CD8/CD45RO) как в ядре опухоли (CT), так и в инвазивном крае (IM) опухоли. Immunoscore обеспечивает оценку в баллах от Immunoscore 0 (I0), когда низкие

плотности обоих типов клеток обнаруживаются в обеих областях, до Immunoscore 4 (I4), когда высокие плотности обнаруживаются в обеих областях.

Способы определения Immunoscore описаны, например, у Galon et al. 2014, Pages et al. 2009, Angell et al. 2013 и Galon et al. 2013, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

До сих пор обсуждалось, что опухоли с низким Immunoscore («холодные опухоли») не очень чувствительны к лечению ингибиторами иммунных контрольных точек, такими как антитела к PD-1, к CTLA-4 или к PD-L1, в то время как опухоли с высоким Immunoscore реагируют на такое лечение (см. Bu et al., 2016). Не привязываясь к теории, обоснование этого открытия может заключаться в том, что при отсутствии вовлечения иммунной системы в соответствующую опухоль ингибирование иммунной контрольной точки данным ингибитором не может ничего изменить к лучшему.

Авторы настоящего изобретения установили, что конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, обладает особой иммунологической эффективностью при опухолях, приводя, среди прочего, к иммунной защите от повторного возникновения опухоли. Этого удивительного открытия нельзя было ожидать из результатов, сделанных с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как антитела к PD-1, CTLA-4 или PD-L1. Обоснование последнего, скорее всего, не применимо к конъюгату связывающего белка с токсином, содержащему один или несколько фрагментов антрациклинового токсина.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль, представляет собой опухоль, которая является или была рефрактерной, устойчивой к лечению ингибитором иммунных контрольных точек или рецидивирующей после лечения ингибитором иммунных контрольных точек.

Используемый в настоящем документе термин «рефрактерный» относится к опухоли, которая не может или не отвечает достаточно благоприятным образом с точки зрения уменьшения размера опухоли или продолжительности стабилизации или уменьшения в ответ на лечение ингибитором иммунных контрольных точек.

Используемый в настоящем документе термин «устойчивый» относится к опухоли, которая не может или не отвечает достаточно благоприятным образом с точки зрения уменьшения размера опухоли или продолжительности стабилизации или уменьшения в ответ на лечение ингибитором иммунных контрольных точек в течение времени, составляющего больше чем 3 месяцев и более.

Используемый в настоящем документе термин «рецидивирующий» относится к опухоли, которая появилась снова после лечения ингибитором иммунных контрольных точек, как правило, после периода времени, в течение которого опухоль не могла быть обнаружена. Опухоль может появиться снова в том же месте или в другом месте в теле субъекта.

Такое лечение ингибитором иммунных контрольных точек предпочтительно являлось монотерапией.

Такое лечение ингибитором иммунных контрольных точек предпочтительно было введено в дозировке или по схеме, рекомендованной на этикетке соответствующего лекарственного средства или SOPC.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль, выбрано из группы, состоящей из следующего:

- меланома,
- формы рака или опухоли толстой и прямой кишки,
- формы рака или опухоли поджелудочной железы
- глиобластома,
- формы рака или опухоли яичника и/или
- формы рака или опухоли предстательной железы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок связывается по меньшей мере с одной мишенью, выбранной из группы, состоящей из следующего:

- ROR1
- CS1
- HER2
- мезотелин (MN) и/или
- ROR2.

Среди них предпочтительной мишенью является ROR1.

Эти мишени и антитела к ним описаны в следующих публикациях:

- US2019112385A1 (мезотелин)
- US2019153092A1, WO2019016381 (ROR1)
- WO2019030240A1 (CS-1),
- US2018028682 (HER2) и
- WO2019016392A1 (ROR2),

содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительно, указанные мишени происходят от человека. В частности, ROR1, когда упоминается в настоящем документе, означает, предпочтительно, ROR1 человека.

Используемый в настоящем документе термин «ингибитор иммунных контрольных точек» относится к любому связывающему агенту или соединению, подходящему для действия против белка иммунной контрольной точки. В частности, «ингибитор иммунных контрольных точек» относится к любому связывающему агенту или соединению, подходящему для модуляции активности белка иммунной контрольной точки, чтобы поддерживать активность иммунной системы и, в частности, способность Т-клеток распознавать раковые клетки и действовать против них. Белки иммунных контрольных точек могут являться положительными (т.е. они поддерживают активность Т-клеток и иммунный ответ) или отрицательными (т.е. они ограничивают активность Т-клеток и иммунный ответ). В случае положительного белка иммунной контрольной точки, ингибитор иммунных контрольных точек означает связывающий агент или соединение, подходящее для усиления активности этого белка иммунной контрольной точки. В случае отрицательного белка иммунной контрольной точки, ингибитор иммунных контрольных точек означает связывающий агент или соединение, подходящее для ингибирования активности этого белка иммунной контрольной точки.

Иммунная контрольная точка представляет собой белок, который регулирует иммунную систему (Pardoll D.M. "*The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy*", Nature, 2012, том 12, стр. 252-264), и имеет решающее значение для самотолерантности, что предотвращает атаку иммунной системы на клетки без разбора, предпочтительно выбранный из группы, раскрытой в следующей таблице:

Тип	**Альтернативное название**	**Полное название**	**Uni Prot**	**Положительный или отрицательный белок иммунной контрольной точки**
PD-1	CD279	Белок 1 запрограммированной гибели клеток	Q15116	Отрицательный
CTLA-4	CD152	Цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами	P16410	Отрицательный

PD-L1	CD274, гомолог 1 B7	Лиганд 1 белка запрограммированной гибели клеток	Q9NZQ7	Отрицательный
PD-L2	B7-DC, CD273	Лиганд 2 белка запрограммированной гибели клеток	Q9BQ51	Отрицательный
LAG3	CD223	Ген 3 активации лимфоцитов	P18627	Отрицательный
CD40	TNFRSF5	Представитель 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	P25942	Положительный
CD40L	CD154	Лиганд CD154	P29965	Положительный
TIM3	HAVCR2	Клеточный рецептор 2 вируса гепатита A	Q8TDQ0	Отрицательный
OX40	TNFRSF4, CD134	Представитель 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей	P43489	Положительный
OX40L		Лиганд для CD134L	P23510	Положительный
CD112	PVRL2, нектин-2	Связанный с рецепторами полиовируса 2	Q92692	
CD155		Рецептор полиовируса	P15151	Отрицательный
B7-H3	**CD276**		Q5ZPR3	Отрицательный
B7-H4	VTCN1	Ингибитор активации 1 T-клеток, содержащий домен V-набора	Q7Z7D3	Положительный
IDO1		Индоламин-2,3-диоксигеназа 1	P14902	
IDO2		Индоламин-2,3-диоксигеназа 2	Q6ZQW0	
TDO2		Триптофан-2,3-диоксигеназа	P48775	
TIGIT	WUCAM Vstm3	T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM	Q495A1	Отрицательный
Галектин-9			O00182	Отрицательный
GITR		Рецептор фактора некроза опухоли, индуцированный глюкокортикоидами	Q9Y5U5	Положительный

GITRL		Лиганд рецептора фактора некроза опухоли, индуцированного глюкокортикоидами	Q9UNG2	Положительный

Например, белок контрольной точки PD-1, экспрессируемый на поверхности Т-клеток, препятствует атаке этими Т-клетками других клеток организма. Когда PD-1 Т-клетки связывается с PD-L1 на поверхности клетки, Т-клетка не вызывает иммунного ответа против этой клетки. Некоторые раковые клетки экспрессируют высокий уровень PD-L1, что помогает им избежать атаки иммунной системы. Соответственно, антитела, которые связывают PD-1 или PD-L1 и соответственно ингибируют их связывание друг с другом, служат для стимулирования иммунного ответа против раковых клеток. CTLA-4 является еще одним таким отрицательным белком иммунной контрольной точки, экспрессируемым на Т-клетках.

Согласно одной группе вариантов осуществления неопластическое заболевание характеризуется как «холодная» опухоль, характеризующаяся Immunoscore, составляющим $I < 1$.

Immunoscore представляет собой способ оценки прогноза пациентов с раком, основанный на иммунных клетках, которые инфильтруют рак и окружают его. Immunoscore был одобрен на международном уровне для лечения рака толстой и прямой кишки. Он основан на выводах Galon с соавт. (2006), которые выявили положительную связь цитотоксических Т-клеток и Т-клеток памяти с выживаемостью пациентов с раком толстой и прямой кишки.

Immunoscore включает в себя эффекты иммунного ответа хозяина в классификацию рака и повышает точность прогноза. Он измеряет плотность двух популяций Т-лимфоцитов (CD3/CD8, CD3/CD45RO или CD8/CD45RO) в центре и на периферии опухоли. Immunoscore дает оценку в баллах от 0 (I0), когда низкие плотности обоих типов клеток обнаруживаются в обеих областях, до Immunoscore 4 (I4), когда высокие плотности обнаруживаются в обеих областях. Immunoscore не измеряет, как организованы иммунные клетки на периферии опухоли, или количество В-клеток, третичных лимфоидных структур и зародышевых центров. Все они играют важную роль в иммунном ответе на рак толстой и прямой кишки и другие формы рака.

Согласно одному варианту осуществления холодная опухоль представляет собой опухоль с Immunoscore I0 или I1, и предпочтительно представляет собой опухоль с Immunoscore I1.

Согласно другому варианту осуществления термин «холодная опухоль» означает злокачественную или неопластическую ткань, которая характеризуется отсутствием или недостаточной инфильтрацией иммунных клеток. Уровень иммунной инфильтрации отражает, распознает ли иммунная система опухоль.

Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая не отвечает на ингибитор иммунных контрольных точек, когда указанный ингибитор иммунных контрольных точек вводится *in vivo* в виде монотерапии. Согласно этому варианту осуществления и по сравнению с моделью иммунокомпетентных мышей «холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая, возникнув у мыши, не отвечает в значительной степени (по сравнению с группой контроля носителем) на ингибитор иммунных контрольных точек, вводимый в качестве монотерапии в дозе вплоть до приблизительно 10 мг/кг, или до 20 мг/кг, или до максимально переносимой дозы (MTD) в этой модели с использованием мышей. Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль у человека представляет собой опухоль, которая не отвечает в значительной степени на ингибитор иммунных контрольных точек, введенный в дозе в соответствии с этикеткой на ингибиторе иммунных контрольных точек, например, в качестве монотерапии в дозе вплоть до 10 мг/кг, например, при 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг или 200 или 240 мг, необязательно с введением дозы каждые 2-3 недели.

Согласно другому варианту осуществления и в отношении солидных опухолей человека «холодная» опухоль может быть определена относительно критериев RECIST (критерии оценки ответа в солидных опухолях), опубликованных в феврале 2000 г. (Therasse P. et al., "*New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors*", Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, No. 3, February 2, 2000) и обновленных в 2009 г. (Eisenhauer E.A. et al., "*New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)*", European Journal of Cancer, Volume 45, Issue 2, 228 - 247). В этом контексте, согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая ассоциирована с менее чем частичным ответом («PR»; т.е. опухоль, которая прогрессирует («PD», прогрессирующее заболевание) или остается стабильной («SD», стабильное заболевание) после лечения одним или несколькими ингибиторами иммунных контрольных точек, введенных в соответствии с инструкциями на этикетке ингибиторов иммунных контрольных точек. Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая ассоциирована с менее чем частичным ответом («PR»; т.е. опухоль, которая прогрессирует («PD», прогрессирующее заболевание) или остается стабильной («SD», стабильное заболевание) после лечения одним или несколькими ингибиторами иммунных контрольных точек, введенных в течение

по меньшей мере 6 недель, предпочтительно по меньшей мере 8 недель, более предпочтительно по меньшей мере 12 недель. Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль рака молочной железы, которая прогрессирует после терапии с помощью антитела к PD-L1.

Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая ассоциирована с прогрессирующим заболеванием («PD») по меньшей мере через 6 недель, предпочтительно по меньшей мере через 8 недель, более предпочтительно по меньшей мере через 12 недель после введения одного или нескольких ингибиторов иммунных контрольных точек, введенных в соответствии с инструкциями на этикетке ингибитора иммунной контрольной точки.

Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая перестает отвечать на один или несколько ингибиторов иммунных контрольных точек, т.е. опухоли, которые ранее отвечали на лечение одним или несколькими ингибиторами иммунных контрольных точек, но перестали отвечать.

Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль также может быть определена как опухоль, которая рецидивирует (т.е. подвергается пониженному ответу на лечение) после начального ответа на один или несколько ингибиторов иммунных контрольных точек, причем последние вводят в соответствии с инструкциями на этикетке ингибитора иммунных контрольных точек.

Согласно другому варианту осуществления «холодная» опухоль представляет собой опухоль, классифицированную клиницистами как «холодная» опухоль. Конкретные, неограничивающие, примеры «холодных» опухолей включают в себя опухоли рака толстой и прямой кишки, которые характеризуются низким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-низкий; Sinicrope, F. "*The Role of Microsatellite Instability Testing in Management of Colorectal Cancer*", Clinical Advances in Hematology & Oncology Volume 14, Issue 7 July 2016). Известно, что такие опухоли нечувствительны к ингибиторам иммунных контрольных точек. Эти опухоли можно идентифицировать как «холодные» без предварительного лечения одним или несколькими ингибиторами иммунных контрольных точек для установления отсутствия ответа.

Как обсуждалось выше, «холодные опухоли» не очень чувствительны к лечению ингибиторами иммунных контрольных точек, такими как антитела к PD-1 или к CTLA-4. Обоснование этого феномена может заключаться в том, что при отсутствии взаимодействия иммунной системы с соответствующей опухолью подавление иммунной контрольной точки данным ингибитором не может ничего изменить к лучшему.

В частности, известно, что «холодными» опухолями являются подгруппа меланомы, формы рака или опухоли толстой и прямой кишки, формы рака или опухоли поджелудочной железы, глиобластома, формы рака или опухоли яичника и формы рака или опухоли предстательной железы.

Авторы настоящего изобретения показывают, что с помощью лечения, включающего в себя (i) конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, и (ii) ингибитор иммунных контрольных точек, такие «холодные» опухоли можно эффективно лечить.

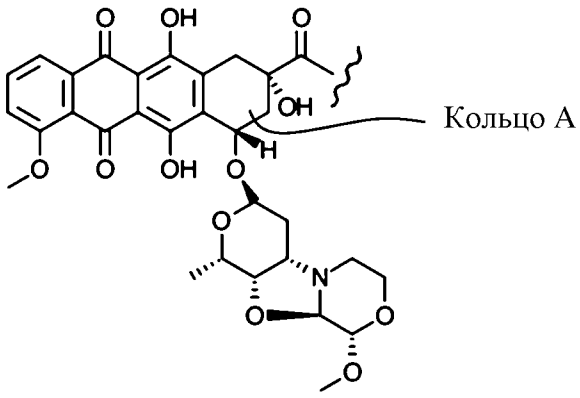
Это открытие является неожиданным, и его нельзя было ожидать из результатов, сделанных с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как виды терапии с помощью антител к PD-1, CTLA-4 или PD-L1, а также с помощью содержащих антрациклин конъюгатов связывающего белка с токсином. Не связываясь с теорией, по-видимому, содержащий антрациклин конъюгат связывающего белка с токсином способен сделать «холодные» опухоли восприимчивыми к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек, т.е. преобразовать их в «горячие» опухоли, так чтобы их можно было эффективно лечить с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек.

Предпочтительно интервал, в течение которого пациенту вводят два разных агента, не превышает максимально четырех недель.

Согласно одному варианту осуществления конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько антрациклиновых токсинов, вводят перед ингибитором иммунной контрольной точки.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один фрагмент антрациклинового токсина представляет собой PNU-159682, который раскрыт в Quintierei et al. 2005.

Согласно другому варианту осуществления по меньшей мере один фрагмент антрациклинового токсина представляет собой производное антрациклина PNU-159682 со следующей формулой (i)



формула (i)

причем указанный токсин конъюгирован по своей волнистой линии со связывающим белком посредством линкера.

Антрациклины, производные от PNU, и их применение в конъюгатах антитела с лекарственным средством подробно описаны в WO2016102679, переуступленной тому же заявителю. Содержание этой публикации включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другой группе вариантов осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из следующего:

- анти-PD-1
- анти-PD-L1
- анти-PD-L2
- анти-CTLA-4
- анти-LAG3
- анти-CD40 или анти-CD40L
- анти-TIM3,
- анти-OX40 или анти-OX40L (CD134/CD134L),
- анти-CD112
- анти-CD155
- анти-B7-H3
- анти-B7-H4
- анти-IDO1
- анти-IDO2
- анти-TDO2
- анти-TIGIT

- анти-GITR, и/или
- анти-галектин-9.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути PD-1/PD-L1, участвующему в ингибировании активации Т-клеток, более предпочтительно моноклональное антитело к PD-1, особенно ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб или тислелизумаб, или более предпочтительно моноклональное антитело к PD-L1, более предпочтительно атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб или BMS-936559.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути PD-1/PD-L2, участвующему в ингибировании активации Т-клеток, более предпочтительно моноклональное антитело к PD-1, особенно ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб или тислелизумаб, или более предпочтительно моноклональное антитело к PD-L2.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути CTLA-4/B7, участвующему в ингибировании активации Т-клеток, более предпочтительно моноклональное антитело к CTLA1-4, более предпочтительно ипилимумаб или тремелимумаб.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути LAG3/MHC класса II, участвующему в ингибировании стимуляции Т-клеток и активности TREG, более предпочтительно моноклональное антитело к LAG3, особенно LAG525, BMS-986016, TSR-033, MK-4280 или REGN3767.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути TIM3/галектин-9, участвующему в снижении функции Т-клеток, более предпочтительно моноклональное антитело к TIM3 или моноклональное антитело к галектину-9.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути TIGIT/CD112, участвующему в ингибировании активации Т-клеток, более предпочтительно моноклональное антитело к TIGIT или моноклональное антитело к CD112.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как антагонист пути TIGIT/CD155, участвующему в ингибировании активации Т-клеток, более предпочтительно моноклональное антитело к TIGIT или моноклональное антитело к CD155.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как агонист в отношении GITR, более предпочтительно агонистическое моноклональное антитело к GITR, особенно GWN323, BMS-986156, MK-4166, MK-1248, TRX518, INCAGN1876, AMG 228 или INBRX-110.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как агонист в отношении OX40, особенно агонистические моноклональные антитела к OX40, такие как MOXR0916, PF-04518600, MEDI0562, MEDI6469 или MEDI6383.

Предпочтительно, ингибитор контрольной точки представляет собой соединение или моноклональное антитело, действующее как агонист в отношении CD40, особенно агонистические моноклональные антитела к CD40, такие как CP-870 или CP-893.

Среди ингибиторов контрольных точек, обсужденных выше, соединения или моноклональные антитела, связывающие или действующие как антагонист

- PD-1
- PD-L1
- CTLA-4 и/или
- B7,

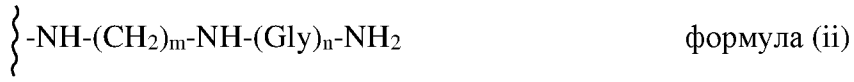
являются особенно предпочтительными, причем наиболее предпочтительными мишенями являются PD-1 и PD-L1.

Согласно другой группе вариантов осуществления конъюгат содержит по своей волнистой линии линкерную структуру X – L_1 – L_2 – L_3 – Y, где L_1 - L_3 представляют линкеры, и два из L_1 - L_3 являются обязательными, и где X и Y дополнительно представляют каждый один или несколько необязательных линкеров.

Согласно другой группе вариантов осуществления линкерная структура содержит в качестве L_2 олигоглициновый пептид $(Gly)_n$, соединенный с указанным производным антрациклина, напрямую или с помощью другого линкера L_1, и где n является целым числом ≥ 1 и ≤ 21, предпочтительно от 2 до 5. Важно понимать, что согласно одному конкретному варианту осуществления (где используется сортаза A Streptococcus pyogenes, см. ниже) олигоглицин $(Gly)_n$ может быть необязательно заменен олигоаланином $(Ala)_n$ или смешанными пептидами Gly/Ala.

Согласно другой группе вариантов осуществления олигоглициновый пептид $(Gly)_n$ конъюгирован с производным антрациклина согласно формуле (i) с помощью алкилендиаминового (EDA) линкера, обозначенного как L_1, причем алкилендиаминовый линкер конъюгирован с производным антрациклина посредством первой амидной связи, в то время как она конъюгирована с карбокси-концом олигоглицинового пептида

посредством второй амидной связи, причем указанный конъюгат алкилендиаминового линкера и олигоглицинового пептида характеризуется следующей формулой (ii),



формула (ii)

где волнистой линией показана связь с производным антрациклина согласно формуле (i), где m представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 11, предпочтительно от 2 до 5, и n представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 21, предпочтительно от 2 до 5. Важно понимать, что согласно одному конкретному варианту осуществления (где используется сортаза A Streptococcus pyogenes, см. ниже) олигоглицин $(Gly)_n$ может быть необязательно заменен олигоаланином $(Ala)_n$.

Согласно другой группе вариантов осуществления олигоглициновый пептид $(Gly)_n$, напрямую или с помощью другого линкера L_1, соединен с кольцом A производного антрациклина согласно формуле (ii) (где кольцо A ядра антрациклина имеет такой вид, как изображено в Shi et al., 2009). Важно понимать, что согласно одному конкретному варианту осуществления (где используется сортаза A Streptococcus pyogenes, см. ниже) олигоглицин $(Gly)_n$ может быть необязательно заменен олигоаланином $(Ala)_n$.

Согласно другой группе вариантов осуществления олигоглициновый пептид $(Gly)_n$ конъюгирован с производным антрациклина согласно формуле (i) с помощью алкиленаминового линкера (EA), обозначенного как L_1, причем алкиленаминовый линкер конъюгирован с карбокси-концом олигоглицинового пептида посредством амидной связи, указанный конъюгат алкиленаминового линкера и олигоглицинового пептида характеризуется следующей формулой (iii)

формула (iii)

где волнистой линией показана связь с производным антрациклина согласно формуле (i), где m представляет собой целое число от ≥ 1 до ≤ 11, предпочтительно от 2 до 5, и n представляет собой целое число от ≥ 1 до ≤ 21, предпочтительно от 2 до 5. Важно понимать, что согласно одному конкретному варианту осуществления (где используется сортаза A Streptococcus pyogenes, см. ниже) олигоглицин $(Gly)_n$ может быть необязательно заменен олигоаланином $(Ala)_n$.

Согласно другой группе вариантов осуществления линкерная структура L_3 содержит пептидный мотив, который является результатом специфического расщепления мотива распознавания фермента сортазы.

Мотив распознавания фермента сортазы служит в качестве метки для так называемой конъюгации антител, опосредованной ферментом сортазой (технология SMAC), которая подробно описана в WO2014140317, переуступленной тому же заявителю. Содержание этой публикации включено в настоящий посредством ссылки. В этой технологии фермент сортаза конъюгирует две молекулы, одна из которых несет такой мотив распознавания, а другая - олигоглициновый пептид $(Gly)_n$. Важно понимать, что согласно одному конкретному варианту осуществления (где используется сортаза A Streptococcus pyogenes, см. ниже) олигоглицин $(Gly)_n$ может быть необязательно заменен олигоаланином $(Ala)_n$.

Согласно другой группе вариантов осуществления указанный мотив распознавания фермента сортазы содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей: LPXTG, LPXAG, LPXSG, LAXTG, LPXTA или NPQTN, причем X представляет собой любую возможную аминокислотную последовательность.

Согласно другой группе вариантов осуществления полученный линкер характеризуется по меньшей мере одной из следующих аминокислотных последовательностей: $-LPXTG_n-$, $-LPXAG_n-$, $-LPXSG_n-$, $-LAXTG_n-$, $-LPXTG_n-$, $-LPXTA_n-$ или $-NPQTG_n-$, причем G_n представляет собой олиго- или полиглицин, где n является целым числом от ≥ 1 до ≤ 21, A_n представляет собой олиго- или полиаланин, где n является целым числом от ≥ 1 до ≤ 21, и X представляет собой любую возможную аминокислотную последовательность.

Согласно другой группе вариантов осуществления производное антрациклина конъюгировано с помощью одного или нескольких линкеров с карбокси-концом связывающего белка или с карбокси-концом по меньшей мере одного его домена или субъединицы.

Согласно другой группе вариантов осуществления связывающий белок конъюгирован с амино-концом олигоглицинового пептида $(Gly)_n$ посредством амидной связи. Важно понимать, что согласно одному конкретному варианту осуществления (где используется сортаза A Streptococcus pyogenes, см. ниже) олигоглицин $(Gly)_n$ может быть необязательно заменен олигоаланином $(Ala)_n$.

Используемая сортаза предпочтительно представляет собой сортазу A. Согласно одному варианту осуществления она представляет собой сортазу A из Streptococcus pyogenes или Staphylococcus aureus. Согласно одному варианту осуществления используется сконструированная сортаза A, которая все еще распознавала мотив распознавания сортазы A. Согласно одному варианту осуществления сконструированная сортаза A происходит из сортазы A Streptococcus pyogenes. Согласно еще одному варианту

осуществления сконструированная сортаза А происходит из сортазы А Staphylococcus aureus.

Согласно другой группе вариантов осуществления связывающий белок представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из антитела, связывающего белка на основе антитела, модифицированного формата антитела, сохраняющего способность связывания с мишенью, производного антитела или фрагмента, сохраняющего способность к связыванию с мишенью, альтернативного каркаса и/или миметика антитела.

Среди вышеперечисленных антитела являются наиболее предпочтительным типом связывающего белка.

Термины «антитело», «связывающий белок на основе антитела», «модифицированный формат антитела, сохраняющий способность связывания с мишенью», «производное или фрагмент антитела, сохраняющий способность связывания с мишенью» относятся к полипептидной цепи(цепям), которая(ые) проявляет(ют) сильное моновалентное, двухвалентное или поливалентное связывание с данным антигеном, эпитопом или эпитопами. Антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием любой подходящей технологии, например гибридомной технологии, рибосомного дисплея, фагового дисплея, библиотек перетасовки генов, полусинтетических или полностью синтетических библиотек или их комбинаций. Антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению включают в себя интактные антитела и фрагменты антител или антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат антигенсвязывающие части интактного антитела и сохраняют способность связывать родственный антиген. Если не указано иное в настоящем документе, все пептидные последовательности, включая в себя все последовательности антител и антигенсвязывающих фрагментов указаны в порядке N → C.

Интактное антитело, как правило, содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа), соединенные дисульфидными связями. Известные гены иммуноглобулинов, кодирующие цепи антител, включают в себя гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также многочисленные гены вариабельной области иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Каждая тяжелая цепь

антитела состоит из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи. В случае IgG константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя различные клетки иммунной системы и первый компонент (Clq) классической системы комплемента. Моноклональные антитела (mAb) состоят из идентичных молекул антител.

Области V_H и V_L антитела могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются с более консервативными каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Расположение областей CDR и FR и система нумерации были определены, например, системой IMGT (Lefranc MP et al., 2015), как используется в настоящем документе.

Антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению также включают в себя одноцепочечные антитела. Термин «одноцепочечное антитело» относится к полипептиду, содержащему домен V_H и домен V_L в полипептидной связи, как правило, связанный через спейсерный пептид, и который может содержать дополнительные домены или аминокислотные последовательности на амино- и/или карбоксильных концах. Например, одноцепочечное антитело может содержать связующий сегмент для связывания с кодирующим полинуклеотидом. Например, одноцепочечный фрагмент вариабельной области (scFv) представляет собой одноцепочечное антитело. По сравнению с доменами V_L и V_H фрагмента Fv, которые кодируются отдельными генами, scFv имеет два домена, соединенных (например, с помощью рекомбинантных способов) синтетическим линкером. Это позволяет получить их в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H образуют пары с образованием моновалентных молекул.

Примерами связывающих белков на основе антител являются полипептиды, в которых связывающие домены антител объединены с другими полипептидами или полипептидными доменами, например, альтернативные молекулярные каркасы, Fc-области, другие функциональные или связывающие домены других полипептидов или антител, что дает в результате молекулы с дополнительными связывающими свойствами, например би- или мультиспецифические белки или антитела. Такие полипептиды могут

создавать расположение связывающих или функциональных доменов, обычно не обнаруживаемое во встречающихся в природе антителах или фрагментах антител.

Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1}; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча интактного антитела; (v) стабилизированные дисульфидом Fv (dsFv), которые имеют межцепочечную дисульфидную связь, сконструированную между структурно консервативными каркасными областями; (vi) однодоменное антитело (dAb), которое состоит из домена V_H или V_L (см., например, Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989); и (vii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) в виде линейного или циклического пептида.

Антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению также включают в себя однодоменные антигенсвязывающие единицы, которые имеют каркас, относящийся к верблюдовым. Животные в семействе верблюдовых включают в себя верблюдов, лам и альпака. Верблюдовые вырабатывают функциональные антитела, лишенные легких цепей. Вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) укладывается автономно и функционирует независимо как антигенсвязывающая единица. Его связывающая поверхность включает в себя только три CDR по сравнению с шестью CDR в классических антигенсвязывающих молекулах (Fab) или одноцепочечных вариабельных фрагментах (scFv). Антитела верблюдовых способны достигать аффинности связывания, сравнимой с аффинностью общепринятых антител.

Термин «антитело человека» относится к антителу, связывающему белку на основе антитела или антигенсвязывающему фрагменту, который содержит последовательности, происходящие из иммуноглобулинов человека, так что по существу все области CDR имеют человеческое происхождение, и по существу все области FR соответствуют последовательности иммуноглобулина человека.

Термины «альтернативный каркас» и «миметик антитела» относятся к белкам, не принадлежащим к семейству иммуноглобулинов, и даже не являются белками, такие как аптамеры или синтетические полимеры. Некоторые типы имеют структуру бета-листов, подобную антителам. Потенциальные преимущества «миметиков антител» или «альтернативных каркасов» по сравнению с антителами заключаются в лучшей растворимости, более высоком проникновении в ткани, более высокой устойчивости к нагреванию и ферментам и сравнительно низкой стоимости производства.

Некоторые миметики антител могут быть предоставлены в больших библиотеках, которые предлагают кандидатов для специфического связывания с каждой возможной мишенью. Как и в случае с антителами, специфические для мишеней миметики антител могут быть разработаны с использованием технологий высокопроизводительного скрининга (HTS), а также с использованием известных технологий дисплея, таких как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дрожжевой дисплей или дисплей млекопитающих. Разработанные в настоящее время миметики антител включают в себя, например, белки анкириновых повторов (называемые DARPin), лектины C-типа, белки A-домена S. aureus, трансферрины, липокалины, домены 10-го типа III фибронектина, ингибиторы протеазы домена Kunitz, связывающие вещества, происходящие из убиквитина (называемые аффилинами), связывающие вещества, происходящие из гамма-кристаллина, цистеиновые узлы или ноттинсы, связующие на основе каркаса тиоредоксина A, аптамеры нуклеиновых кислот, искусственные антитела, полученные путем молекулярного импринтинга полимеров, библиотеки пептидов из бактериальных геномов, домены SH-3, страдотела, «A-домены» мембранных рецепторов, стабилизированных дисульфидными связями и Ca2+, соединения на основе CTLA4, Fyn SH3 и аптамеры (молекулы олигонуклеиновой кислоты или пептидов, которые связываются с определенными молекулами-мишенями).

Антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут связываться с любой подходящей мишенью на раковой клетке или в окружении раковых клеток опухоли. Согласно одному варианту осуществления антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связываются с мишенью на поверхности раковых клеток. Согласно предпочтительному варианту осуществления эта мишень экспрессируется исключительно на раковой клетке или избыточно экспрессируется на раковой клетке по сравнению со здоровой тканью. Заявитель настоящего изобретения предполагает, что любая мишень, с которой антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связываются с раковой клеткой и которая вызывает интернализацию антител, связывающих белков на основе антител и антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению в клетку вместе с фрагментом антрациклинового токсина, приводя к гибели иммуногенной клетки и/или инфильтрации иммунных клеток (например, Т-клеток) в опухоль, является подходящей мишенью. Квалифицированный специалист способен идентифицировать такие мишени путем изучения литературы и экспериментов.

Согласно одному варианту осуществления подходящие мишени включают в себя ROR1, CS-1, HER2, мезотелин и ROR2. Согласно одному варианту осуществления антитела, связывающие белки на основе антител и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связываются с ROR1.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок, содержащийся в конъюгате связывающего белка с токсином, представляет собой антитело, которое

a) содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи, содержащихся в паре последовательностей вариабельного домена тяжелой цепи/легкой цепи, представленной в следующих парах SEQ ID NO:

1 и 2; 3 и 4, 5 и 6 и/или 20 и 21

b) содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи, содержащий следующие SEQ ID NO, в следующем порядке (HCDR1; HCDR2; HCDR3; LCDR1; LCDR2 и LCDR3)

- 22, 23, 24, 25, 26 и 27,
- 28, 29, 30, 31, 32 и 33,
- 34, 35, 36, 37, 38 и 39 и/или
- 40, 41, 42, 43, 44 и 45.

c) содержит определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно b), при условии, что по меньшей мере одна из CDR содержит до 3 аминокислотных замен относительно соответствующих SEQ ID NO, и/или

d) содержит определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно b) или c), при условии, что по меньшей мере одна из CDR характеризуется идентичностью последовательностей, составляющей $\geq$ 66%, по отношению к соответствующим SEQ ID NO,

причем CDR встроены в подходящий белковый каркас, чтобы быть способными связываться с ROR1 с достаточной аффинностью связывания.

Используемый в настоящем документе термин «CDR» или «определяющая комплементарность область» предназначен для обозначения несмежных сайтов связывания антигена, обнаруженных в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области были описаны Kabat et al. (1977), Kabat et al. (1991), Chothia et al. (1987) и MacCallum et al., (1996), где определения включают в себя перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител или их вариантов, как предполагается, находится в пределах объема термина, определенного и

используемого в настоящем документе. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из приведенных выше ссылок, представлены в таблице ниже для сравнения. Обратите внимание, что эта нумерация может отличаться от CDR, которые фактически раскрыты в прилагаемом перечне последовательностей, потому что определения CDR меняются от случая к случаю.

	Kabat	Chothia	MacCallum
VH CDR1	31-35	26-32	30-35
VH CDR2	50-65	53-55	47-58
VH CDR3	95-102	96-101	93-101
VL CDR1	24-34	26-32	30-36
VL CDR2	50-56	50-52	46-55
VL CDR3	89-97	91-96	89-96

Определения CDR

Используемый в настоящем документе термин «каркас» при использовании в отношении вариабельной области антитела вводится для обозначения всех аминокислотных остатков за пределами областей CDR в вариабельной области антитела. Следовательно, каркас вариабельной области имеет длину приблизительно 100-120 аминокислот, но предназначен для обозначения только тех аминокислот, которые не входят в CDR.

Используемый в настоящем документе термин «способный связываться с мишенью X с достаточной аффинностью связывания» следует понимать как означающий, что соответствующий связывающий домен связывает мишень с K_D, составляющей 10^{-4} или меньше. K_D представляет собой равновесную константу диссоциации, отношение k_{off}/k_{on} между белком-связующим и его антигеном. K_D и аффинность обратно пропорциональны. Значение K_D относится к концентрации белка-связующего (количество белка-связующего, необходимого для конкретного эксперимента) и, таким образом, чем ниже значение K_D (более низкая концентрация) и, следовательно, тем выше аффинность связывающего домена. В следующей таблице показаны типичные диапазоны K_D моноклональных антител.

Значение K_D	Молярный диапазон
10^{-4} - 10^{-6}	Микромолярный (мкМ)
10^{-7} - 10^{-9}	Наномолярный (нМ)

10^{-10} - 10^{-12}	Пикомолярный (пМ)
10^{-13} - 10^{-15}	Фемтомолярный (фМ)

K_D и молярные значения

Предпочтительно белок-связующее содержит до 2 аминокислотных замен, а более предпочтительно до 1 аминокислотной замены.

Предпочтительно, по меньшей мере одна из CDR характеризуется идентичностью последовательности, составляющей ≥ 67%; ≥ 68%; ≥ 69%; ≥ 70%; ≥ 71%; ≥ 72%; ≥ 73%; ≥ 74%; ≥ 75%; ≥ 76%; ≥ 77%; ≥ 78%; ≥ 79%; ≥ 80%; ≥ 81%; ≥ 82%; ≥ 83%; ≥ 84%; ≥ 85%; ≥ 86%; ≥ 87%; ≥ 88%; ≥ 89%; ≥ 90%; ≥ 91%; ≥ 92%; ≥ 93%; ≥ 94%; ≥ 95%; ≥ 96%; ≥ 97%; ≥ 98%; ≥ 99%, и наиболее предпочтительно 100% по отношению к соответствующей SEQ ID NO.

Используемый в настоящем документе термин «процент идентичности последовательностей» определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептидом), которая не содержит добавлений или делеций, для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательностей.

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности характеризуются определенным процентом одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (т.е. по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по указанной области или, если не указано иное, по всей последовательности эталонной последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, измеренной с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью выравнивания вручную и визуального осмотра. В

настоящем раскрытии представлены полипептиды или полинуклеотиды, которые по существу идентичны полипептидам или полинуклеотидам, соответственно, приведенным в настоящем документе в качестве примеров. Необязательно идентичность существует в области, которая составляет по меньшей мере примерно 15, 25 или 50 нуклеотидов в длину, или более предпочтительно в области, которая составляет от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов в длину, или по всей длине эталонной последовательности. Что касается аминокислотных последовательностей, идентичность или существенная идентичность может существовать в области, которая составляет по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислот в длину, необязательно по меньшей мере приблизительно 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 аминокислот в длину, необязательно по меньшей мере приблизительно 150, 200 или 250 аминокислот в длину или по всей длине эталонной последовательности. Что касается более коротких аминокислотных последовательностей, например, аминокислотных последовательностей из 20 или менее аминокислот, существенная идентичность существует, когда один или два аминокислотных остатка консервативно заменены в соответствии с консервативными заменами, определенными в настоящем документе.

Предпочтительно, по меньшей мере одна из CDR подвергнута модификации последовательности CDR, включая в себя

- созревание аффинности
- снижение иммуногенности.

Созревание аффинности представляет собой процесс увеличения аффинности данного антитела *in vitro*. Как и естественный аналог, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и отбора. Его успешно использовали для оптимизации антител, фрагментов антител или других пептидных молекул, таких как миметики антител. Случайные мутации внутри CDR вводятся с использованием облучения, химических мутагенов или ПЦР с использованием ошибающейся полимеразы. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено путем перестановки цепей. Два или три раунда мутации и отбора с использованием таких методов дисплея, как фаговый дисплей, как правило, приводят к получению фрагментов антител с аффинностью в низком наномолярном диапазоне. Принципы см. в Eylenstein et al. (2016), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Сконструированные антитела содержат области CDR, происходящие из последовательности мыши, которые были привиты вместе с любыми необходимыми обратными мутациями каркасной области в V-области, происходящие из последовательности. Следовательно, сами CDR могут вызывать иммуногенные реакции

при введении пациенту гуманизированного антитела. Способы снижения иммуногенности, вызванной CDR, раскрыты у Harding et al. (2010), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок, содержащийся в конъюгате связывающего белка с токсином, представляет собой антитело, в котором

a) пары вариабельных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD), представленные в следующих парах SEQ ID NO:

1 и 2; 3 и 4, 5 и 6 и/или 20 и 21

b) пары вариабельных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD) согласно a), при условии, что

- HCVD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей ≥ 80% по отношению к соответствующей SEQ ID NO, и/или

- LCVD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей ≥ 80% по отношению к соответствующей SEQ ID NO,

c) пары вариабельных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (VD) согласно a) или b) при условии, что по меньшей мере один из HCVD или LCVD содержит до 10 аминокислотных замен по отношению к соответствующей SEQ ID NO,

указанный белок-связующее все еще способен связывать ROR1 с достаточной аффинностью связывания.

«Вариабельный домен», когда он используется в отношении антитела или его тяжелой или легкой цепи, предназначен для обозначения части антитела, которая обеспечивает связывание антигена с молекулой и которая не является константной областью. Термин предназначен для включения их функциональных фрагментов, которые частично поддерживают функцию связывания всей вариабельной области. Связывающие фрагменты вариабельной области включают в себя, например, функциональные фрагменты, такие как Fab, $F(ab)_2$, Fv, одноцепочечный Fv (scFv) и т.п. Такие функциональные фрагменты хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Соответственно, использование этих терминов при описании функциональных фрагментов гетеромерной вариабельной области предназначено для соответствия определениям, хорошо известным специалистам в настоящей области техники. Такие термины описаны, например, в Huston et al., (1993) или Plückthun and Skerra (1990).

Предпочтительно HCVD и/или LCVD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей ≥ 81%; ≥ 82%; ≥ 83%; ≥ 84%; ≥ 85%; ≥ 86%; ≥ 87%; ≥

88%; ≥ 89%; ≥ 90%; ≥ 91%; ≥ 92%; ≥ 93%; ≥ 94%; ≥ 95%; ≥ 96%; ≥ 97%; ≥ 98%; ≥ 99%; или наиболее предпочтительно 100% по отношению к соответствующей SEQ ID NO.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая является консервативной аминокислотной заменой.

Используемый в настоящем документе термин «консервативная аминокислотная замена» оказывает меньшее влияние на функцию антитела, чем неконсервативная замена. Хотя существует множество способов классификации аминокислот, их часто разделяют на шесть основных групп на основе их структуры и общих химических характеристик их R-групп.

Согласно некоторым вариантам осуществления «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Например, в настоящей области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи. Эти семейства включают в себя аминокислоты со следующим:

- основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин),
- кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота),
- незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин),
- неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан),
- бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и
- ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Другие консервативные аминокислотные замены могут также происходить в семействах аминокислотных боковых цепей, например, при замене аспарагина на аспарагиновую кислоту для изменения заряда пептида. Консервативные изменения могут дополнительно включать в себя замену химически гомологичных неприродных аминокислот (т.е. синтетическую неприродную гидрофобную аминокислоту вместо лейцина, синтетическую неприродную ароматическую аминокислоту вместо триптофана).

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок характеризуется аффинностью связывания мишени с ROR1, составляющей по меньшей мере 50% по сравнению с таковой у антитела согласно приведенному выше описанию.

Используемый в настоящем документе термин «аффинность связывания» предназначен для обозначения силы связывающего взаимодействия и, следовательно, включает в себя как фактическую аффинность связывания, так и кажущуюся аффинность связывания. Фактическая аффинность связывания представляет собой отношение скорости ассоциации к скорости диссоциации. Следовательно, придание или оптимизация аффинности связывания включает в себя изменение одного или обоих этих компонентов для достижения требуемого уровня аффинности связывания. Кажущаяся аффинность может включать в себя, например, авидность взаимодействия. Например, связывающий фрагмент двухвалентной гетеромерной вариабельной области может проявлять измененную или оптимизированную аффинность связывания из-за своей валентности.

Подходящим способом измерения аффинности связывающего агента является поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Этот способ основан на явлении, которое возникает при возбуждении поверхностных плазмонных волн на границе раздела металл/жидкость. Свет направляется и отражается от той стороны поверхности, которая не контактирует с образцом, и SPR вызывает уменьшение интенсивности отраженного света при определенной комбинации угла и длины волны. Биомолекулярные события связывания вызывают изменения показателя преломления в поверхностном слое, которые обнаруживаются как изменения в сигнале SPR. Событие связывания может быть либо ассоциацией связывания, либо диссоциацией между парой рецептор-лиганд. Изменения показателя преломления можно измерить практически мгновенно, что позволяет определять отдельные компоненты константы аффинности. В частности, способ позволяет точно измерить скорость ассоциации (k_{on}) и скорость диссоциации (k_{off}).

Измерения значений k_{on} и k_{off} могут быть полезными, поскольку они могут идентифицировать измененные вариабельные области или оптимизированные вариабельные области, которые терапевтически более эффективны. Например, измененная вариабельная область или ее гетеромерный связывающий фрагмент могут быть более эффективными, потому что они имеют, например, более высокое значение k_{on} по сравнению с вариабельными областями и гетеромерными связывающими фрагментами, которые проявляют аналогичную аффинность связывания. Повышенная эффективность достигается благодаря тому, что молекулы с более высокими значениями k_{on} могут специфически связываться и ингибировать свою мишень с большей скоростью. Аналогично молекула согласно настоящему изобретению может быть более эффективной, потому что она проявляет более низкое значение k_{off} по сравнению с молекулами, имеющими аналогичную аффинность связывания. Повышенная эффективность, наблюдаемая с молекулами, имеющими более низкие скорости k_{off}, может наблюдаться, потому что после связывания

молекулы медленнее диссоциируют от своей мишени. Хотя они описаны со ссылкой на измененные вариабельные области и оптимизированные вариабельные области согласно настоящему изобретению, включая в себя их гетеромерные связывающие фрагменты вариабельной области, описанные выше способы измерения скоростей ассоциации и диссоциации применимы практически к любому белку-связующему или его фрагменту для идентификации более эффективных связывающих средств в лечебных или диагностических целях.

Другим подходящим способом измерения аффинности связывающего агента является поверхностный анализ FACS/Скэтчарда.

Способы измерения аффинности, включая в себя скорости ассоциации и диссоциации с использованием поверхностного плазмонного резонанса, хорошо известны в настоящей области техники и могут быть описаны, например, в Jonsson and Malmquist (1992) и Wu et al. (1998). Более того, одним прибором, хорошо известным в настоящей области техники для измерения взаимодействий связывания, является прибор BIAcore 2000, который коммерчески доступен от Pharmacia Biosensor (Уппсала, Швеция).

Предпочтительно указанная аффинность связывания с мишенью составляет $\geq$ 51%, $\geq$ 52%, $\geq$ 53%, $\geq$ 54%, $\geq$ 55%, $\geq$ 56%, $\geq$ 57%, $\geq$ 58%, $\geq$ 59%, $\geq$ 60%, $\geq$ 61%, $\geq$ 62%, $\geq$ 63%, $\geq$ 64%, $\geq$ 65%, $\geq$ 66%, $\geq$ 67%, $\geq$ 68%, $\geq$ 69%, $\geq$ 70%, $\geq$ 71%, $\geq$ 72%, $\geq$ 73%, $\geq$ 74%, $\geq$ 75%, $\geq$ 76%, $\geq$ 77%, $\geq$ 78%, $\geq$ 79%, $\geq$ 80%, $\geq$ 81%, $\geq$ 82%, $\geq$ 83%, $\geq$ 84%, $\geq$ 85%, $\geq$ 86%, $\geq$ 87%, $\geq$ 88%, $\geq$ 89%, $\geq$ 90%, $\geq$ 91%, $\geq$ 92%, $\geq$ 93%, $\geq$ 94%, $\geq$ 95%, $\geq$ 96%, $\geq$ 97%, $\geq$ 98%, и наиболее предпочтительно $\geq$ 99% по сравнению с эталонным связывающим агентом.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок конкурирует за связывание ROR1 с антителом согласно приведенному выше описанию.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения связывающий белок связывается с по существу той же или с той же областью на ROR1, что и антитело согласно приведенному выше описанию.

Используемый в настоящем документе термин «конкурирует за связывание» используется в отношении одного из антител, определенных последовательностями, как указано выше, что означает, что фактический белок-связующее имеет активность, которая связывается с той же мишенью, или целевым эпитопом, или доменом, или субдоменом, как и указанная последовательность, определяемая белком-связующим, и является вариантом последнего. Эффективность (например, кинетика или термодинамика) связывания может быть такой же и выше или меньше эффективности последней. Например, равновесная константа связывания для связывания с субстратом может быть разной для двух антител.

Такую конкуренцию за связывание можно подходящим образом измерить с помощью анализа конкурентного связывания. Такие анализы раскрыты в Finco et al. 2011, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и их значение для интерпретации формулы изобретения раскрыто в Deng et al 2018, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Для проверки этой характеристики доступны подходящие технологии картирования эпитопов, в том числе, среди прочего:

- рентгеновская сокристаллография и криогенная электронная микроскопия (крио-ЭМ)
- сканирование олигопептидов на основе матрицы
- картирование сайт-направленного мутагенеза
- высокопроизводительное картирование эпитопов при мутагенезе методом дробовика
- водородно-дейтериевый обмен, и/или
- масс-спектрометрия, сопряженная с образованием поперечных связей.

Эти способы, среди прочего, раскрыты и обсуждаются в Banik et al (2010) и DeLisser (1999), содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Хотя изобретение было проиллюстрировано и подробно описано на графических материалах и в предшествующем описании, такие иллюстрации и описание следует считать иллюстративными или представленными в качестве примера, а не ограничивающими; настоящее изобретение не ограничивается раскрытыми вариантами осуществления. Другие варианты раскрытых вариантов осуществления могут быть поняты и осуществлены специалистами в настоящей области техники при практическом применении заявленного изобретения на основе изучения графических материалов, настоящего раскрытия и прилагаемой формулы изобретения. В формуле настоящего изобретения слово «содержащий» не исключает другие элементы или стадии, а формы единственного числа не исключают множественное число. Простой факт, что определенные меры изложены во взаимно различных зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что комбинация этих мер не может быть использована для благоприятного результата. Любые ссылочные позиции в формуле изобретения не следует рассматривать как ограничение объема.

Все раскрытые в настоящем документе аминокислотные последовательности показаны от N-конца к С-концу; все последовательности нуклеиновых кислот, раскрытые в настоящем документе, показаны 5' → 3'.

Пример 1. Получение очищенных рекомбинантных антител к ROR1 человека и антител изотипического контроля

Экспрессионные векторы: Кодирующие области вариабельной области антитела получали с помощью общего генного синтеза (GenScript) с использованием MNFGLRLIFLVLTLKGVQC в качестве лидерной последовательности и собирали с константными областями IgH-γ1 и IgL-**κ** или IgL-λ человека, если это применимо, в экспрессионном векторе pCB14. Этот вектор, производное эписомального экспрессионного вектора млекопитающих pCEP4 (Invitrogen), несет точку начала репликации EBV, кодирует ядерный антиген EBV (EBNA-1), позволяющий происходить внехромосомной репликации, и содержит маркер селекции на основе пуромицина вместо исходного гена устойчивости к гигромицину B.

Экспрессия и очистка: Экспрессионные векторы на основе pCB14 трансфицировали в клетки HEK293T с использованием реагента Lipofectamine® LTX с реагентом PLUS™ (Thermo Fisher Scientific, Райнах, Швейцария, 15388100); после 1-дневной инкубации (37°C, 5% CO_2, среда для выращивания: среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с L-глутамином с 10% (об./об.) фетальной сывороткой теленка (FCS), 100 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин-фунгизона и 2 мМ L-глутамина (все Bioconcept, Allschwil, Швейцария)), клетки размножали в условиях отбора (2 мкг/мл пуромицина (Sigma-Aldrich, Buchs SG, Швейцария, P8833- исходный раствор 25 мг с концентрацией 2 мг/мл)). Клетки разделяли и дополнительно размножали (37°C, 5% CO_2); по достижении конфлюентности чашки для культивирования тканей покрывали 20 мкг/мл поли-L-лизина (Sigma-Aldrich, P1524) в течение 2 ч при 37°C и дважды промывали PBS. Затем клетки обрабатывали трипсином и разделяли 1:3 на планшеты, покрытые поли-L-лизином. Снова после достижения конфлюентности клетки промывали PBS с последующей заменой среды на среду для продукции (DMEM/F-12, Gibco/Thermo Fisher Scientific, 31330-03) с добавлением 1 мкг/мл пуромицина (Sigma, P8833), 100 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин-фунгизона (Bioconcept), 161 мкг/мл N-ацетил-L-цистеина (Sigma-Aldrich, A8199) и 10 мкг/мл восстановленного L-глутатиона (Sigma-Aldrich, G6529). Супернатант, собираемый раз в две недели и отфильтрованный (0,22 мкм) для удаления клеток, хранили при 4°C до очистки.

Для очистки отфильтрованный супернатант загружали в PBS-уравновешенную колонку Protein A HiTrap (GE Healthcare, Франкфурт-на-Майне, Германия, 17-0405-01) или колонку JSR Amsphere™ Protein A (JSR Life Sciences, Лёвен, Бельгия, JWT203CE) и промывали PBS; элюирование проводили с использованием 0,1 M глицина (pH 2,5) на

AEKTA pure (GE Healthcare). Фракции немедленно нейтрализовали 1 М трис-HCl буфером (pH 8,0) и анализировали на чистоту и целостность белка с помощью SDS-PAGE. Содержащие белок фракции смешивали и подвергали замене буфера с использованием фильтровальных установок Amicon (Millipore, Шаффхаузен, Швейцария, UFC901008) до разбавления 1:100 в PBS, а затем стерилизовали фильтрованием с использованием фильтра с низким удерживанием (0,20 мкм, Carl Roth, Карлсруэ, Германия, PA49.1).

Антитела временно экспрессировали в клетках CHO способами, известными в настоящей области техники, и рекомбинантные антитела очищали стандартной очисткой на основе белка А из супернатантов клеток CHO, как известно в настоящей области техники. Чистоту и целостность рекомбинантных антител анализировали с помощью SDS-PAGE.

Таблица 1. Антитела к hROR1 и изотипического контроля, используемые в примерах

Антитело	**Формат**	**SEQ ID HC/LC антитела**	**С-концевые метки (HC: тяжелая цепь, LC: легкая цепь)**
XBR1-402 (mAb202)	IgG	HC: SEQ ID NO.1 LC: SEQ ID NO.2	HC: LPETG-Strep LC: G_4LPETG-Strep
Ac10 (mAb046)	IgG	HC: SEQ ID NO.3 LC: SEQ ID NO.4	HC: LPETG-Strep LC: G_4SLPETG-Strep
2A2 (mAb066)	IgG	HC: SEQ ID NO.5 LC: SEQ ID NO.6	HC: LPETG-Strep LC: G_4SLPETG-Strep
huXBR1-402-17 (mAb357)	IgG	HC: SEQ ID NO.20 LC: SEQ ID NO.21	HC: нет LC: G_4SLPETG-TwinStrep
Ac10 (mAb340)	IgG	HC: SEQ ID NO.3 LC: SEQ ID NO.4	HC: нет LC: G_4SLPETG-TwinStrep

Пример 2. Конъюгация mAb с токсинами, модифицированными глицином, с образованием ADC с использованием SMAC-technology™

Сортаза А. Рекомбинантный и аффинно очищенный фермент сортаза А на основе сортазы A Staphylococcus aureus получали в E. coli согласно методикам, описанным в WO2014140317A1.

Образование токсинов, модифицированных глицином. Для создания конъюгированных с помощью SMAC-technology™ ADC Concortis производил производное

пентаглицин-EDA-PNU (G5-EDA-PNU) (изображено на фигуре 1). Идентичность и чистоту токсинов, модифицированных пентаглицином, подтверждали масс-спектрометрией и ВЭЖХ соответственно. G5-EDA-PNU показал чистоту > 95%, как определено с помощью хроматографии ВЭЖХ.

Конъюгация антител, опосредованная сортазой. Вышеупомянутый токсин конъюгировали с антителами в соответствии с таблицей 2 путем инкубации mAb с меткой LPETG [10 мкМ] с токсином, модифицированным глицином [200 мкМ] и 3 мкМ сортазы A в указанном буфере для конъюгации в течение 3,5 часов при 25°C. Реакцию останавливали, пропуская ее через колонку rProtein A GraviTrap (BioRad). Связанный конъюгат элюировали 5 объемами колонки элюирующего буфера (0,1 М глицин, pH 2,5, 50 нМ NaCl), фракции 1 объема колонки собирали в пробирки, содержащие 25% об./об. 1М HEPES pH 8 для нейтрализации кислоты. Фракции, содержащие белок, объединяли и составляли в буфере для состава, приведенном в таблице 2, с использованием колонки для обессоливания ZebaSpin.

Аналитика ADC. Отношение лекарственное средство-антитело (DAR) оценивали с помощью обращенно-фазовой хроматографии, выполняемой на колонке Polymer Labs PLRP 2,1 мм × 5 см, 5 мкм при 1 мл/мин/80°C с 25-минутным линейным градиентом от 0,05 до 0,1% TFA/H2O и от 0,04 до 0,1% TFA/CH_3CN. Образцы сначала восстанавливали инкубацией с DTT при pH 8,0 при 37°C в течение 15 минут. DAR, определенный с помощью обращенно-фазовой хроматографии, обобщенно представлен в таблице 2 ниже.

Таблица 2: Обобщенные аналитические данные относительно ADC, изготовленных в этом исследовании. DAR, соотношение лекарственное средство/антитело. ND, не определено

ADC	**mAb** (эталон.)	**Токсин**	**Буфер для конъюгации**	**Буфер для состава**	**DAR**
XBR1-402-G5-PNU	XBR1-402 (mAb202)	G5-PNU	50 мМ HEPES (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$	PBS	ND
Ac10-G5-PNU	Ac10 (mAb046)	G5-PNU	50 мМ HEPES (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$	PBS	3,7
Ac10-G3-PNU	Ac10 (mAb340)	G3-PNU	250 мМ HEPES, pH 7,5, 5 мМ $CaCl_2$, 50% глицерин	PBS	1,9

huXBR1-402-17-G3-PNU	huXBR1-402-17	G3-PNU	250 мМ HEPES, pH 7,5, 5 мМ $CaCl_2$, 50% глицерин	15 мМ гистидин, pH 6,5, 175 мМ сахароза, 0,02% Tween20	1,9
huXBR1-402-17-G2-PNU	huXBR1-402-17	G2-PNU	250 мМ HEPES, pH 7,5, 5 мМ $CaCl_2$, 50% глицерин	15 мМ гистидин pH 6,5, 175 мМ сахароза, 0,02% Tween20	2,0

Из этих анализов можно сделать вывод, что конъюгация SMAC-technology™ прошла с высокой эффективностью.

Пример 3. Получение клеток EMT-6, стабильно экспрессирующих ROR1 человека

Клетки рака молочной железы EMT-6 мыши культивировали в полной среде DMEM (среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с L-глутамином с 10% (об./об.) фетальной сывороткой теленка (FCS), 100 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин-фунгизона и 2 мМ L-глутамина (все Bioconcept, Allschwil, Швейцария)) при 37°C и 5% CO_2. Клетки сконструировали для избыточной экспрессии ROR1 путем транспозиции следующим образом: клетки центрифугировали (6 мин, 290 × g, 4 ° C) и ресуспендировали в среде RPMI-1640 (5×10^6 клеток/мл). Затем 400 мкл клеточной суспензии добавляли к 400 мкл RPMI, содержащего 13,3 мкг любого мобильного вектора pPB-PGK-Puro-ROR1 (управляющего коэкспрессией полноразмерного ROR1 (NP_005003.2) вместе с геном устойчивости к пуромицину) и 6,6 мкг вектора pCDNA3.1_hy_mPB, содержащего транспозазу. Смесь клеток DNA/EMT-6 переносили в кюветы для электропорации (с зазором 0,4 см, 165-2088, BioRad, Cressier, Швейцария) и подвергали электропорации с использованием Biorad Gene Pulser II с расширителем емкости при 300 В и 950 мкФ. Затем клетки инкубировали 5-10 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки центрифугировали при 290 × g в течение 6 минут в центрифуге Eppendorf 5810R, промывали один раз и затем ресуспендировали в DMEM до инкубации при 37°C в термостате с контролем влажности в атмосфере 5% CO_2. Через день после электропорации пулы клеток, стабильно экспрессирующие ROR1 человека, отбирали путем добавления 3 мкг/мл пуромицина (Sigma-Aldrich, P8833).

Одноклеточные клоны, экспрессирующие ROR1, получали из выбранных с помощью селекции антибиотиком клеток EMT-6-ROR1. Вкратце, после трипсинизации 10^6 клеток центрифугировали в пробирках для FACS; полученные осадки ресуспендировали в буфере (PBS с 2% (об./об.) FCS). Затем клетки инкубировали с антителом 2A2 к ROR1 в течение 30 минут (4°C, конечная концентрация 2 мкг/мл) с последующим центрифугированием и промыванием. Затем клетки ресуспендировали, как и ранее, и инкубировали с PE антителом к IgG человека (Fc гамма-специфическим) (eBioscience, Вена, Австрия, 12-4998-82) с разведением 1:250 в темноте (30 мин, 4°C), промывали один раз в буфере и хранили на льду до одноклеточной сортировки антиген-экспрессирующих клеток с помощью FACS с использованием прибора FACSAriaII (BD Biocsiences, Сан-Хосе, США).

Пример 4. Оценка *in vivo* анти-ROR1 ADC на модели сингенной опухоли молочной железы EMT-6-ROR1.

1×10^6 опухолевых клеток клона 14 EMT-6-ROR1 в 100 мкл PBS ортотопически имплантировали в жировую подушку молочной железы каждой мыши BALB/c. При достижении среднего объема опухоли приблизительно 30-80 $мм^3$ (измерено штангенциркулем) в день 0 (D0) мышей случайным образом разделяли на группы по 8 животных в каждой в соответствии с размером опухоли. Затем мышей лечили один раз разными дозами (0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг и 1 мг/кг) (фигура 3), чтобы определить субоптимальную дозу, при которой ADC приводят только к частичному противоопухолевому ответу. После этого создавали те же модели для лечения низкой дозой ADC, включая в себя совпадающий по изотипу контрольный ADC и с или без комбинированного лечения с помощью 10 мг/кг ингибитора иммунных контрольных точек mAb к CTLA4 9D9 в соответствии с таблицей 3. Мышей подвергали мониторингу в течение не менее 40 дней и подвергали эвтаназии в случае чрезмерной опухолевой нагрузки или признаков дистресса. Ингибитор иммунных контрольных точек 9D9 является ингибитором мышиного CTLA-4, и его составляли в PBS и приобретали в BioXcell, West Lebanon, Нью-Гэмпшир, США.

Таблица 3: Экспериментальные группы для оценки *in vivo* ADC на основе токсинов PNU в комбинации с ингибиторами контрольных точек

Группа		**Концентрация лечения**	**Применение**		
			Объем	Путь	Схема после рандомизации
1	Контроль носителем	-	5 мл/кг	в/в	Один раз D0

2	Ac10-G5-PNU (изотипический контроль)	0,25 мг/кг	5 мл/кг	в/в	Один раз D0
4	XBR1-402-G5-PNU	0,25 мг/кг	5 мл/кг	в/в	Один раз D0
6	антитело α-mCTLA-4 (9D9) + Ac10-G5-PNU (изотипический контроль)	10 мг/кг + 0,25 мг/кг	5 мл/кг	в/б + в/в	D2 и еще две процедуры с интервалом 3-4 дня + Один раз D0
11	антитело α-mCTLA-4 (9D9) + XBR1-402-G5-PNU	10 мг/кг + 0,25 мг/кг	5 мл/кг + 5 мл/кг	в/б + в/в	D2 и еще две процедуры с интервалом 3-4 дня + Один раз D0

Объемы опухоли определяли на основании измерения размера опухоли штангенциркулем дважды в неделю. Для расчета групповых медианных объемов опухолей учитывали значения от животных, которые были живы в рассматриваемый день. Кроме того, объемы опухолей животных, которые были подвергнуты эвтаназии из-за их опухолевой нагрузки, переносили с использованием методологии переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF) до тех пор, пока это увеличивало средний/медианный объем опухоли в группе.

На фигуре 4 представлена динамика изменения опухоли для отдельных мышей, а также динамика изменения медианного объема опухоли. Динамика изменения объема опухоли для отдельных мышей, получавших (A) контроль носителем, (B) изотипический контроль Ac10-G5-PNU, (C) изотипический контроль XBR1-402-G5-PNU, (D) изотипический контроль Ac10-G5-PNU вместе с антителом 9D9 к CTLA-4 мыши, (E) XBR1-402-G5-PNU вместе с антителом 9D9 к CTLA-4 мыши. (F) Динамика изменения медианного объема опухоли в группе (с применением методологии переноса данных последнего наблюдения вперед (LOCF)) для следующих групп: контроль носителя, изотипический контроль Ac10-G5-PNU и XBR1-402-G5-PNU. (G) Медианная эволюция объема опухоли в группе (с применением методологии Last-Observation-Carried-Forward (LOCF)) для следующих групп: контроль носителем, изотипический контроль Ac10-G5-PNU и антитело 9D9 к CTLA-4 мыши и XBR1-402-G5-PNU и антитело 9D9 к CTLA-4 мыши.

Как показывают результаты на фигуре, комбинация XBR1-402-G5-PNU и антитела 9D9 к CTLA-4 мыши обеспечивает усиленные противоопухолевые ответы по сравнению с индивидуальным лечением только ADC в дозе 0,25 мг/кг. Кроме того, панель D показывает, что относительно контроля носителем (панель A) и изотипического контроля (панель B) антитело 9D9 к CTLA-4 мыши демонстрирует некоторую противоопухолевую эффективность, подтверждая, что модель опухоли EMT-6-ROR1 может быть охарактеризована как модель «горячей» опухоли.

Кроме того, все выжившие мыши в группе 11 (но не в других группах? - может быть, тогда важно показать?) были защищены от роста опухоли при повторном их возникновении (день 102) с помощью $1x10^6$ опухолевых клеток клона 14 EMT-6-ROR1, имплантированных в жировую подушку молочной железы без предварительной инъекции (не показано), что указывает на то, что только в комбинации ADC с ингибитором контрольной точки генерировался защитный противоопухолевый иммунный ответ.

Пример 5. Получение клеток CT-26 и B16-F10, стабильно экспрессирующих ROR1 человека

Клетки карциномы толстой кишки мыши CT-26 и клетки меланомы B16-F10 («B16») (оба типа из ATCC) культивировали в среде RPMI с 10% (об./об.) фетальной телячьей сывороткой (FCS), 100 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин-фунгизона и 2 мМ L-глутамина (все Bioconcept, Allschwil, Швейцария) при 37°C и 5% CO_2. Клетки сконструировали для избыточной экспрессии ROR1 путем транспозиции следующим образом: клетки центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5810R (6 мин, 290 × g, 4°C) и ресуспендировали в среде RPMI (5×10^6 клеток/мл). Затем 400 мкл клеточной суспензии добавляли к 400 мкл RPMI, содержащего 13,3 мкг мобильного вектора pPB-PGK-Puro-ROR1 (управляющего коэкспрессией полноразмерного ROR1 (NP_005003.2) вместе с геном устойчивости к пуромицину) и 6,6 мкг содержащего транспозазу вектора pcDNA3.1_hy_mPB. Смесь клеток DNA/CT-26 или B16 переносили в кюветы для электропорации (с зазором 0,4 см, 165-2088, BioRad, Cressier, Швейцария) и подвергали электропорации с использованием Biorad Gene Pulser II с расширителем емкости при 300 В и 950 мкФ. Затем клетки инкубировали 5-10 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки центрифугировали при 290 × g в течение 6 минут, один раз промывали и затем ресуспендировали в полной RPMI перед инкубацией при 37°C в термостате с контролем влажности в атмосфере 5% CO_2. Через день после электропорации пулы клеток, стабильно экспрессирующие ROR1 человека, отбирали путем добавления 3 мкг/мл пуромицина (Sigma-Aldrich, P8833).

Одноклеточные клоны CT-26, экспрессирующие ROR1, получали из клеток, отобранных антибиотиком. Вкратце, после трипсинизации 10^6 клеток центрифугировали в пробирках для FACS; полученные осадки ресуспендировали в буфере (PBS с 2% (об./об.) FCS). Затем клетки инкубировали с антителом к ROR1 XBR1-402 в течение 30 мин (4°C, конечная концентрация 2 мкг/мл) с последующим центрифугированием и промывкой. Затем клетки ресуспендировали, как ранее, и инкубировали с антителом к IgG человека (Fc гамма-специфическим) PE (eBioscience, Вена, Австрия, 12-4998-82) в разведении 1: 250 в темноте (30 мин, 4°C), промывали один раз в буфере и хранили на льду до одноклеточной сортировки антиген-экспрессирующих клеток с помощью FACS с использованием прибора FACSAria II (BD Biocsiences, Сан-Хосе, США). На фигуре 5 (A) показаны результаты окрашивания FACS сконструированного клона 3 CT-26. Экспрессия ROR1 в пулах B16, используемых в эксперименте ниже, также определяли с помощью FACS (фигура 5 (B)).

Пример 6. Модель карциномы толстой кишки CT26 с избыточной экспрессией hROR1 у мышей, получавшая лечение с помощью анти-ROR1 ADC и комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек

CT26 вызывает опухоли от «теплых» до «горячих» в моделях на мышах, что означает, что они отвечают на ингибиторы иммунных контрольных точек при достаточно высоких дозах (Mosely, S. et al., 2017). Экспериментальные группы, согласно таблице 4, каждая содержала восемь самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель. 1×10^6 опухолевых клеток клона 3 CT-26-ROR1 (из примера 5) в 100 мкл PBS имплантировали односторонне в бок каждой мыши. При достижении среднего объема опухоли приблизительно 30-100 $мм^3$ (измерено штангенциркулем) в день 0 (D0) мышей рандомизировали на группы в соответствии с размером опухоли. Затем мышей лечили в соответствии с таблицей 4 и подвергали мониторингу три раза в неделю в течение 42 дней или до тех пор, пока опухоли не достигли 1500 $мм^3$ (измерено штангенциркулем). RPM1-14 (BioXcell, измерено, Нью-Гэмпшир, США) является ингибитором PD-1 мыши, и его составляли в PBS. Этот ингибитор иммунных контрольных точек вводили в дозе ниже его эффективной дозы в качестве монотерапии, как было ранее определено с помощью Oncotest (данные не показаны).

Таблица 4: Экспериментальные группы для оценки *in vivo* анти-ROR1 ADC с ингибиторами иммунных контрольных точек

Группа (размер группы)		**Концентрация лечения**	**Применение**	
			Путь	Схема после рандомизации
1	Контроль носителем	-	в/в в/б	Один раз D0 D0, D4, D8
2	Ac10-G3-PNU (изотип)	4 мг/кг	в/в	Один раз D0
3	huXBR1-402-17-G3-PNU	4 мг/кг	в/в	Один раз D0
4	Ac10-G3-PNU + антитело α-mPD-1 (RPM1-14)	4 мг/кг + 5 мг/кг	в/в + в/б	Один раз D0 + D0, D4, D8
5	huXBR1-402-17-G3-PNU + антитело α-mPD-1 (RPM1-14)	4 мг/кг + 5 мг/кг	в/в + в/б	Один раз D0 + D0, D4, D8

На фигуре 6 представлено изменение объема опухоли для отдельных мышей в каждой группе: (A) контроль носителем (без лечения) группы 1, (B) изотипический контроль группы 2, (C) анти-ROR1 ADC huXBR1-402-17-G3-PNU группы 3, (D) изотипический контроль вместе с ингибитором иммунных контрольных точек - антителом к PD-1 мыши группы 4, (E) анти-ROR1 ADC huXBR1-402-17-G3-PNU вместе с ингибитором иммунных контрольных точек - антителом к PD-1 мыши группы 7. Подчеркивается, что нацеленный ADC вводили в дозе, значительно меньшей, чем требуется для полного ответа в качестве монотерапии, как показано на панели C. Результаты свидетельствуют о сильном синергизме между оцениваемым ингибитором иммунной контрольной точки и нацеленным ADC, содержащим производное PNU.

Пример 7. Модель меланомы B16 с избыточной экспрессией hROR1 у мышей, получившая лечение с помощью анти-ROR1 ADC и комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек

B16 создает плохо иммуногенные («холодные») опухоли на моделях мышей (Celik, C. et al., 1983), что означает, что они не отвечают на ингибиторы иммунных контрольных точек при дозировке в разумных пределах, то есть приблизительно от 50 до 100 мкг/мышь (Grosso, J. et al., 2013). Экспериментальные группы, согласно таблице 7, содержали по десять 8-9-недельных самок BL6/6NRj. 2×10^5 опухолевых клеток B16-ROR1 (из примера

5) в 100 мкл сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS, Thermo Fischer) вводили внутривенно каждой мыши в день 0 (D0). Мышей рандомизировали в группы простым случайным распределением и лечили в соответствии с таблицей 5 с мониторингом 5 дней в неделю в течение 12-19 дней.

Таблица 5: Экспериментальные группы для оценки *in vivo* анти-ROR1 ADC с ингибиторами иммунных контрольных точек

Группа (размер группы)		**Концентрация лечения**	**Применение**	
			Путь	Схема после рандомизации
1	Контроль носителем	-	в/в в/б	Один раз D1 D1, D5, D9
2	huXBR1-402-17-G2-PNU	4 мг/кг	в/в	Один раз D1
3	антитело α-mCTLA-4 (9D9)	10 мг/кг	в/б	D1, D5, D9
4	huXBR1-402-17-G2-PNU + антитело α-mCTLA-4 (9D9)	4 мг/кг + 10 мг/кг	в/в в/б	Один раз D1 + D1, D5, D9

В последний день мониторинга мышей умерщвляли с помощью CO_2 с последующим забором всего легкого и фиксацией в растворе Буэна (Labforce Bio-Optica). Экспериментально индуцированные метастазы (Saxena M. et al., 2013) на поверхности каждого легкого (представляющие колонии B16-ROR1) визуально подсчитывали и каждый оценивали для отнесения к одной из трех групп (диаметр <1 мм, 1-2 мм, > 2 мм) в слепых условиях. Затем определяли объем колоний на каждом легком в соответствии со следующими формулами (аппроксимируя каждую колонию как сферу):

Объем колонии ($мм^3$) = количество (пятна диаметром <1 мм) × 0,004 $мм^3$ + количество (пятна диаметром 1-2 мм) × 0,21 $мм^3$ + количество (пятна диаметром > 2 мм) × 0,485 $мм^3$

Статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism и непарного T-критерия среднего. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым (*), значение $p \geq 0,5$ считали статистически не значимым (n.s.).

На фигуре 7 представлены объемы колоний в различных группах лечения из таблицы 5. Эти результаты предполагают, что в слабо иммуногенной («холодной») опухоли

без значительного эффекта ингибитора иммунной контрольной точки существует сильный синергизм между оцениваемым ингибитором иммунной контрольной точки и нацеленным ADC, содержащим производное PNU.

Пример 8. Модель меланомы B16 с избыточной экспрессией hROR1 у мышей, получавшая лечение с помощью анти-ROR1 ADC

В экспериментальные группы, согласно таблице 6, входили 8-9-недельные самки BL6/6NRj. 10^6 опухолевых клеток B16-ROR1 (из примера 5) в 100 мкл сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS, Thermo Fischer) имплантировали односторонне в бок каждой мыши. При достижении среднего объема опухоли приблизительно около 250 $мм^3$ (измерено штангенциркулем), в день 0 (D0) мышей рандомизировали в группы в соответствии с размером опухоли согласно таблице 6. Затем мышей лечили согласно таблице 6 и умерщвляли через 24 часа после введения с последующим извлечением опухоли.

Таблица 6: Экспериментальные группы для оценки анти-ROR1 ADC *in vivo*

Группа (размер группы)	**Концентрация лечения**	**Мышей в группе**	**Путь введения**	**Схема лечения**
Не получивший лечение контроль	-	1	-	-
huXBR1-402-17-G2-PNU	4 мг/кг	3	в/в	D0

Опухоли мгновенно замораживали в смеси с оптимальной температурой получения срезов (OKT, от Fischer Scientific). Криосрезы окрашивали с использованием первичных коммерческих антител к CD4 мыши и CD8 мыши (GK1.5 BioLegend 100402, и 53-6.7 BioLegend 100702 соответственно). Обнаружение проводили с использованием антитела к антителу крысы (AlexaFluor488, Invitrogen A21208).

На фигуре 8 показаны репрезентативные изображения окрашивания в отношении CD4 и CD8 криосрезов опухоли B16, избыточно экспрессирующей hROR1 (ROR1 человека), от (A) не получившей лечение контрольной мыши и (B) трех мышей, получавших ADC (однократно, в дозе 4 мг/кг) в соответствии с таблицей 6. Как показано на фигуре 8 (A), опухоли B16, естественным образом содержат низкие уровни CD4+ и CD8+ клеток, что соответствует статусу опухолей B16 как холодных опухолей. На фигуре 8 (B)

показано, что лечение ADC согласно настоящему изобретению увеличивает количество клеток CD4+ и CD8+ в опухоли.

Кроме того, опухоли CT-26 и B-16, избыточно экспрессирующие hROR1 (ROR1 человека), подвергали механическому и ферментативному расщеплению и подвергали окрашиванию FACS на жизнеспособные клетки и маркеры иммунных клеток для подтверждения популяции Т-клеток. Использовали схему окрашивания FACS, представленную в таблице 7, в комбинации с набором LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit для реагента для окрашивания при возбуждении 633 или 635 нм (ThermoFischer).

Таблица 7: Окрашивающие антитела FACS для окрашивания популяций иммунных клеток

Антитело	**Метка**	**Мишень**	**клон**	**№ по кат.**	**Компания**
Антитело к CD45 мыши	PE-CF592	CD45	30-F11	562420	BD Biosciences
Антитело к CD3ε мыши	PE/Cy7	CD3	145-2C11	100319	Biolegend
Антитело к CD4 мыши	PE	CD4	RM4-4	116005	Biolegend
Антитело к CD8a мыши	Alexa Fluor 488	CD8	53-6.7	100726	Biolegend
Антитело к CD137 мыши	APC	4-1BB	17B5	106109	Biolegend
Антитело к Ki-67 мыши	PerCP/Cy5.5	Ki67	16A8	652423	ThermoFisher

На фигуре 9 показано состояние активации положительных в отношении CD4 (панель A) и CD8 (панель B) популяций Т-клеток в двух моделях опухолей (не получившие лечение), что подтверждает «холодную» природу модели опухоли B-16, избыточно экспрессирующей hROR1 (ROR1 человека).

ССЫЛКИ

- Galon J et al., J Pathol 2014; 232: 199–209
- Pages F *et al., J Clin Oncol* 2009; **27:** 5944–5951.
- Angell HK, Galon J, *Curr Opin Immunol* 2013; **25:** 261–267.
- Galon *et al. Immunity* 2013; **39:** 11–26.
- Bu X et al., Trends in Molecular Medicine (2016), Volume 22 , Issue 6 , 448 - 451
- Shi et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2009,**7**, 3709-3722
- Mosely, S. et al. *Cancer Immunology Research*, January 2017
- Saxena M and Christofori G., *Molecular Oncology* 7, 2013, 283-296
- Celik, C. et al. *Cancer Res* 43, 3507-3510, 1983
- Grosso, J. et al. *Cancer Immunity*, 22, 13(5), 2013
- U. Jonsson and M. Malmquist, Adv. Biosens., 1992, 2, 291
- Wu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6037-6042 (1998)
- Banik, SSR; Doranz, BJ (2010). "Mapping complex antibody epitopes". Genetic Engineering & Biotechnology News. 3 (2): 25–8
- DeLisser, HM (1999). Epitope mapping. Methods Mol Biol. 96. pp. 11–20
- Finco et al, Comparison of competitive ligand-binding assay and bioassay formats for the measurement of neutralizing antibodies to protein therapeutics. J Pharm Biomed Anal. 2011 Jan 25;54(2):351-8.
- Deng et al., Enhancing antibody patent protection using epitope mapping information MAbs. 2018 Feb-Mar; 10(2): 204–209
- Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993);
- Plückthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) and in Day, E. D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. (1990)
- Harding, The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. MAbs. 2010 May-Jun; 2(3): 256–265.
- Eylenstein, et al, Molecular basis of in vitro affinity maturation and functional evolution of a neutralizing anti-human GM-CSF antibody, mAbs, 8:1, 176-186 (2016)
- Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) and Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)
- Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)
- MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Следующие ниже последовательности составляют часть раскрытия настоящей заявки. Электронный перечень последовательностей, совместимый с WIPO ST 25, также предоставляется с настоящей заявкой. Во избежание сомнений, если существуют расхождения между последовательностями в следующей таблице и электронным перечнем последовательностей, последовательности в этой таблице считаются правильными.

1	Аминокислотная последовательность HC XBR1-402	QEQQKESGGGLFKPTDTLTLTCTASGFDISSYYMSWVRQAPGNGLEW IGAIGISGNAYYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYF CARDHPTYGMDLWGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	Аминокислотная последовательность LC XBR1-402	SYELTQLPSVSVSLGQTARITCEGNNIGSKAVHWYQQKPGLAPGLLI YDDDERPSGVPDRFSGSNSGDTATLTISGAQAGDEADYYCQVWDSSA YVFGGGTQLTVTGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH KSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
3	Аминокислотная последовательность HC Ac10	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEW IGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSEDTAVY FCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	Аминокислотная последовательность LC Ac10	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQP PKVLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQ SNEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	Аминокислотная последовательность HC 2A2	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFSDYEMHWVIQTPVHGLEW IGAIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCTGYYDYDSFTYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	Аминокислотная последовательность LC 2A2	DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAAVAWYQQKPGQSPKLL IYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIY PYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

7	Последовательность распознавания 1 сортазы A Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту	-LPXTG
8	Последовательность распознавания 2 сортазы A Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту	-LPXAG
9	Последовательность распознавания для сортазы A Staphylococcus aureus или сконструированной сортазы A 4S-9 из Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту	-LPXSG
10	Последовательность распознавания для сконструированной сортазы A 2A-9 из Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту	-LAXTG
11	Последовательность распознавания сортазы A Streptococcus pyogenes, где X представляет собой любую аминокислоту	-LPXTA
12	Последовательность распознавания сортазы Staphylococcus aureus	-NPQTN
13	Линкер, происходящий из последовательности распознавания 1 сортазы A Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту и n ≥ 1 и ≤ 21	-LPXT(Gn)-
14	Линкер, происходящий из последовательности распознавания 2 сортазы A Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту и n ≥ 1 и ≤ 21	-LPXA(Gn)-
15	Линкер, происходящий из последовательности распознавания для сортазы A Staphylococcus aureus или сконструированной сортазы A 4S-9 из Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту и n ≥ 1 и ≤ 21	-LPXS(Gn)-
16	Линкер, происходящий из последовательности распознавания для сконструированной сортазы A 2A-9 из Staphylococcus aureus, где X представляет собой любую аминокислоту и n ≥ 1 и ≤ 21	-LAXT(Gn)-
17	Линкер, происходящий из последовательности распознавания сортазы A Streptococcus pyogenes, где X представляет собой любую аминокислоту и n ≥ 1 и ≤ 21	-LPXT(Gn)- или -LPXT(An)-
18	Линкер, происходящий из последовательности распознавания сортазы Staphylococcus aureus, с n ≥ 1 и ≤ 21	-NPQT(Gn)-
19	Лидерная последовательность	MNFGLRLIFLVLTLKGVQC
20	Аминокислотная последовательность HC huXBR1-402-17	QVQLRESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFDISSYYMSWVRQPPGKGLEWIGAIGISGNAYYASWAKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDHPTYGMDLWGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	Аминокислотная последовательность LC huXBR1-402-17	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCEGNNIGSKAVHWYQQKPGQAPVLVIYDDDERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSAYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
22	HCDR1 XBR1-402	SYYMS
23	HCDR2 XBR1-402	AIGISGNAYYASWAKS
24	HCDR3 XBR1-402	DHPTYGMDL
25	LCDR1 XBR1-402	EGNNIGSKAVH
26	LCDR2 XBR1-402	DDDERPS

27	LCDR3 XBR1-402	QVWDSSAYV
28	HCDR1 Ac10	YTFTDYYIT
29	HCDR2 Ac10	WIGWIYPGSGNTKY
30	HCDR3 Ac10	NYGNYWFAY
31	LCDR1 Ac10	QSVDFDGDSYMN
32	LCDR2 Ac10	VLIYAASNLES
33	LCDR3 Ac10	QQSNEDPW
34	HCDR1 2A2	YTFSDYEMH
35	HCDR2 2A2	WIGAIDPETGGTAY
36	HCDR3 2A2	GYYDYDSFTY
37	LCDR1 2A2	QNVDAAVA
38	LCDR2 2A2	LLIYSASNRYT
39	LCDR3 2A2	QQYDIYPY
40	HCDR1 huXBR1-402-17	FDISSYYMS
41	HCDR2 huXBR1-402-17	WIGAIGISGNAYYASWA
42	HCDR3 huXBR1-402-17	RDHPTYGMDL
43	LCDR1 huXBR1-402-17	NIGSKAVH
44	LCDR2 huXBR1-402-17	LVIYDDDERPS
45	LCDR3 huXBR1-402-17	QVWDSSAY

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, для применения при лечении пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

2. Способ лечения или профилактики неопластического заболевания, характеризуемого как «холодная» опухоль, причем указанный способ предусматривает введение пациенту конъюгата связывающего белка с токсином, содержащего один или несколько фрагментов антрациклинового токсина.

3. Комбинация следующего:

(i) конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, и

(ii) ингибитор иммунных контрольных точек

для применения при лечении пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль;

причем конъюгат связывающего белка с токсином и ингибитор иммунных контрольных точек вводят пациенту одновременно или последовательно, в любом порядке.

4. Способ лечения или профилактики неопластического заболевания, характеризуемого как «холодная» опухоль, причем указанный способ предусматривает введение пациенту следующего:

(i) конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, и

(ii) ингибитор иммунных контрольных точек;

причем конъюгат связывающего белка с токсином и ингибитор иммунных контрольных точек вводят пациенту одновременно или последовательно, в любом порядке.

5. Конъюгат связывающего белка с токсином, содержащий один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, для применения в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки (для производства лекарственного средства) для применения при лечении пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

6. Ингибитор иммунных контрольных точек (ICI) для применения в комбинации с конъюгатом связывающего белка с токсином, содержащим один или несколько фрагментов антрациклинового токсина, конъюгированных со связывающим белком, (для производства лекарственного средства) для применения при лечении пациента

- страдающего от,
- с риском развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль.

7. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 1-6, причем неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль, представляет собой опухоль, которая является или была рефрактерной, устойчивой к лечению ингибитором иммунных контрольных точек или рецидивирующей после лечения ингибитором иммунных контрольных точек.

8. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 1-7, причем неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль, выбрано из группы, состоящей из следующего:

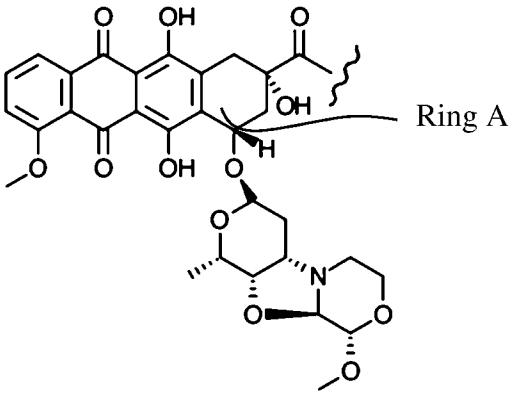
- меланома,
- формы рака или опухоли толстой и прямой кишки,
- формы рака или опухоли поджелудочной железы,
- глиобластома,
- формы рака или опухоли яичника и/или
- формы рака или опухоли предстательной железы.

9. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 1-8, причем связывающий белок связывается по меньшей мере с одной мишенью, выбранной из группы, состоящей из

- ROR1
- CS1
- HER2
- мезотелина (MN) и/или
- ROR2.

10. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 1-9, причем неопластическое заболевание, характеризуемое как «холодная» опухоль, характеризуется Immunoscore, составляющим < 1.

11. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 1-10, причем по меньшей мере один фрагмент антрациклинового токсина представляет собой производное антрациклина PNU-159682 со следующей формулой (i)



формула (i)

причем указанный токсин конъюгирован по своей волнистой линии со связывающим белком через линкер.

12. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 3-11, причем ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из следующего:

- анти-PD-1,
- анти-PD-L1,
- анти-PD-L2,

- анти-CTLA-4,
- анти-LAG3,
- анти-CD40 или анти-CD40L,
- анти-TIM3,
- анти-OX40 или анти-OX40L (CD134/CD134L),
- анти-CD112,
- анти-CD155,
- анти-B7-H3,
- анти-B7-H4,
- анти-IDO1,
- анти-IDO2,
- анти-TDO2,
- анти-TIGIT,
- анти-GITR и/или
- анти-галектин-9.

13. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 1-12, причем конъюгат содержит по своей волнистой линии линкерную структуру X – L_1 – L_2 – L_3 – Y, где L_1 - L_3 представляют собой линкеры, b два из L_1 – L_3 являются обязательными, и где X и Y дополнительно представляют каждый один или несколько необязательных линкеров.

14. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 13, причем линкерная структура содержит в качестве L_2 олигоглициновый пептид $(Gly)_n$, соединенный с указанным производным антрациклина, напрямую или посредством другого линкера L_1, и где n представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 21, предпочтительно от 2 до 5.

15. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 14, причем олигоглициновый пептид $(Gly)_n$ конъюгирован с производным антрациклина согласно формуле (i) посредством алкилендиаминового линкера (EDA), обозначенного как L_1, причем алкилендиаминовый линкер конъюгирован с производным антрациклина посредством первой амидной связи, в то время как он конъюгирован с карбокси-концом олигоглицинового пептида посредством второй амидной связи, причем указанный конъюгат алкилендиаминового линкера и олигоглицинового пептида характеризуется следующей формулой (ii),

формула (ii)

где волнистой линией показана связь с производным антрациклина согласно формуле (i), где m представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 11, и n представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 21, предпочтительно от 2 до 5.

16. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 14 или 15, причем олигоглициновый пептид $(Gly)_n$ напрямую или посредством другого линкера L_1 соединен с кольцом A производного антрациклина согласно формуле (ii).

17. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 14, причем олигоглициновый пептид $(Gly)_n$ конъюгирован с производным антрациклина согласно формуле (ii) посредством алкиленаминового линкера (EA), обозначенного как L_1, причем алкиленаминовый линкер конъюгирован с карбокси-концом олигоглицинового пептида посредством амидной связи, причем указанный конъюгат алкиленаминового линкера и олигоглицинового пептида характеризуется следующей формулой (iii)

формула (iii)

где волнистой линией показана связь с производным антрациклина согласно формуле (ii), где m представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 11, и n представляет собой целое число ≥ 1 и ≤ 21, предпочтительно от 2 до 5.

18. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 13-18, причем линкерная структура L_3 содержит пептидный мотив, который является результатом специфического расщепления мотива распознавания фермента сортазы.

19. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 18, причем указанный мотив распознавания фермента сортазы содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей: LPXTG, LPXAG, LPXSG, LAXTG, LPXTA или NPQTN, где X представляет собой любую возможную аминокислотную последовательность.

20. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 18 или 19, причем полученный линкер характеризуется по меньшей мере одной из следующих аминокислотных

последовательностей: -LPXTG$_n$-, -LPXAG$_n$-, -LPXSG$_n$-, -LAXTG$_n$-, -LPXTG$_n$-, -LPXTA$_n$- или -NPQTG$_n$-, где G$_n$ представляет собой олиго- или полиглицин, где n является целым числом от ≥ 1 до ≤ 21, A$_n$ представляет собой олиго- или полиаланин, где n является целым числом от ≥ 1 до ≤ 21, предпочтительно 2 - 5, и X представляет собой любую возможную аминокислотную последовательность.

21. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по любому из пп. 11-20, причем производное антрациклина конъюгировано посредством одного или нескольких линкеров с карбокси-концом связывающего белка или с карбокси-концом по меньшей мере одного его домена или субъединицы.

22. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по любому из пп. 14-21, причем связывающий белок конъюгирован с амино-концом олигоглицинового пептида $(Gly)_n$ посредством амидной связи.

23. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по любому из пп. 1-22, причем связывающий белок представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из антитела, связывающего белка на основе антитела, модифицированного формата антитела, сохраняющего способность связывания с мишенью, производного антитела или фрагмента, сохраняющего способность связывания с мишенью, альтернативного каркаса и/или миметика антитела.

24. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 23, причем связывающий белок представляет собой антитело, которое

a) содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи, содержащихся в паре последовательностей вариабельного домена тяжелой цепи/легкой цепи, представленной следующими парами SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4, 5 и 6 и/или 20 и 21

b) содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи, содержащий следующие SEQ ID NO, в следующем порядке (HCDR1; HCDR2; HCDR3; LCDR1; LCDR2 и LCDR3)

- 22, 23, 24, 25, 26 и 27,
- 28, 29, 30, 31, 32 и 33,
- 34, 35, 36, 37, 38 и 39 и/или
- 40, 41, 42, 43, 44 и 45.

c) содержит определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно b), при условии, что по меньшей мере одна из CDR содержит до 3 аминокислотных замен относительно соответствующих SEQ ID NO, и/или

d) содержит определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи/легкой цепи согласно b) или c), при условии, что по меньшей мере одна из CDR характеризуется идентичностью последовательностей, составляющей ≥ 66%, по отношению к соответствующим SEQ ID NO,

где CDR встроены в подходящий белковый каркас, чтобы быть способными связываться с ROR1 с достаточной аффинностью связывания.

25. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по п. 23 или 24, причем связывающий белок представляет собой антитело, в котором

a) пары вариабельных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD), представленные в следующих парах SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4, 5 и 6 и/или 20 и 21,

b) пары вариабельных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (HCVD/LCVD) согласно a), при условии, что

- HCVD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей ≥ 80% по отношению к соответствующей SEQ ID NO, и/или
- LCVD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей ≥ 80% по отношению к соответствующей SEQ ID NO,

c) пары вариабельных доменов тяжелой цепи/легкой цепи (VD) согласно a) или b) при условии, что по меньшей мере один из HCVD или LCVD содержит до 10 аминокислотных замен по отношению к соответствующей SEQ ID NO,

указанный белок-связующее все еще способен связывать ROR1 с достаточной аффинностью связывания.

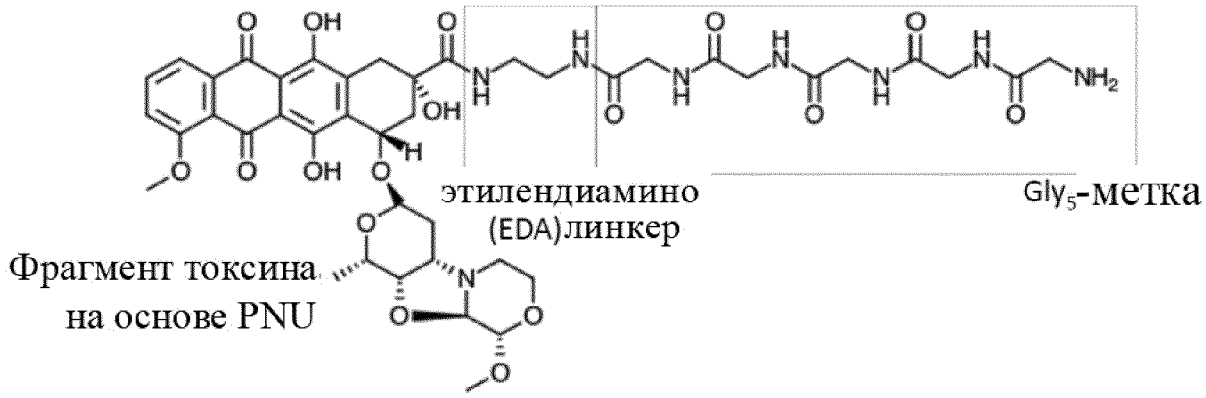
26. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по пп. 24-25, причем связывающий белок содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой консервативную аминокислотную замену.

27. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по любому из пп. 1-26, причем связывающий белок характеризуется аффинностью связывания мишени по отношению к ROR1, составляющей по меньшей мере 50% по сравнению с таковой у антитела по любому из пп. 24-25.

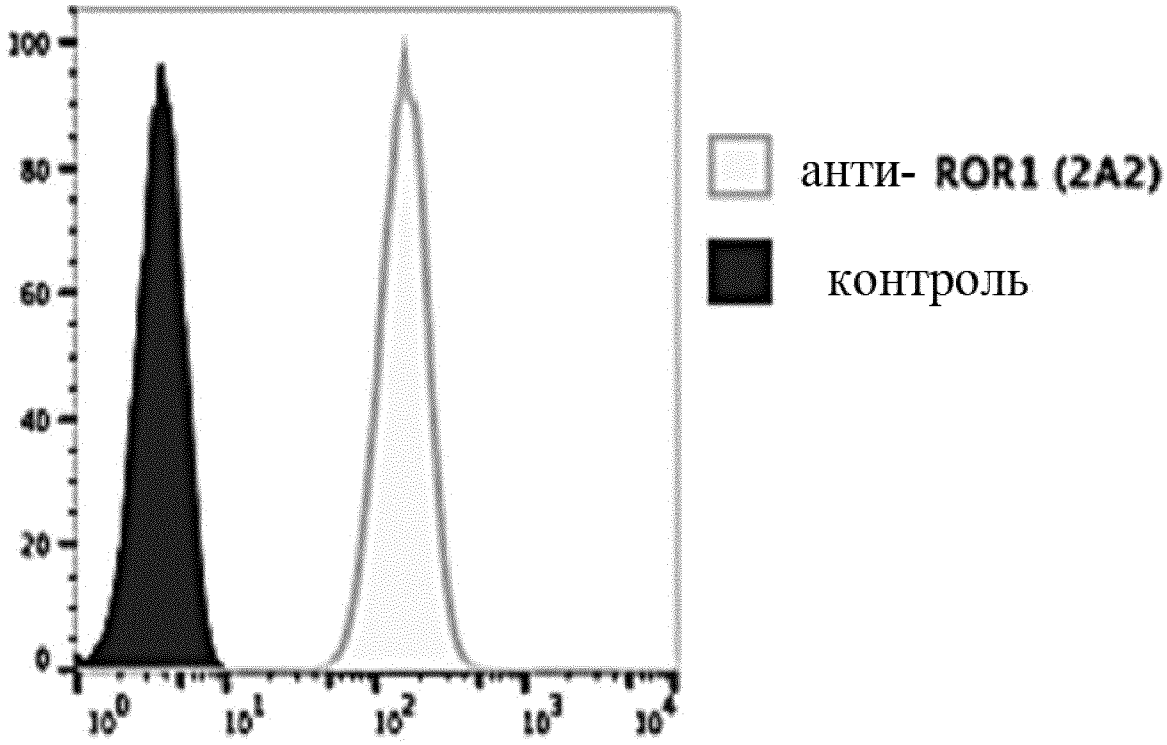
28. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по любому из пп. 1-27, причем связывающий белок конкурирует за связывание ROR1 с антителом по любому из пп. 24-25.

29. Конъюгат, способ, комбинация или ICI по любому из пп. 1-28, причем связывающий белок связывается с по существу той же или той же областью на ROR1, что и антитело по любому из пп. 24-25.

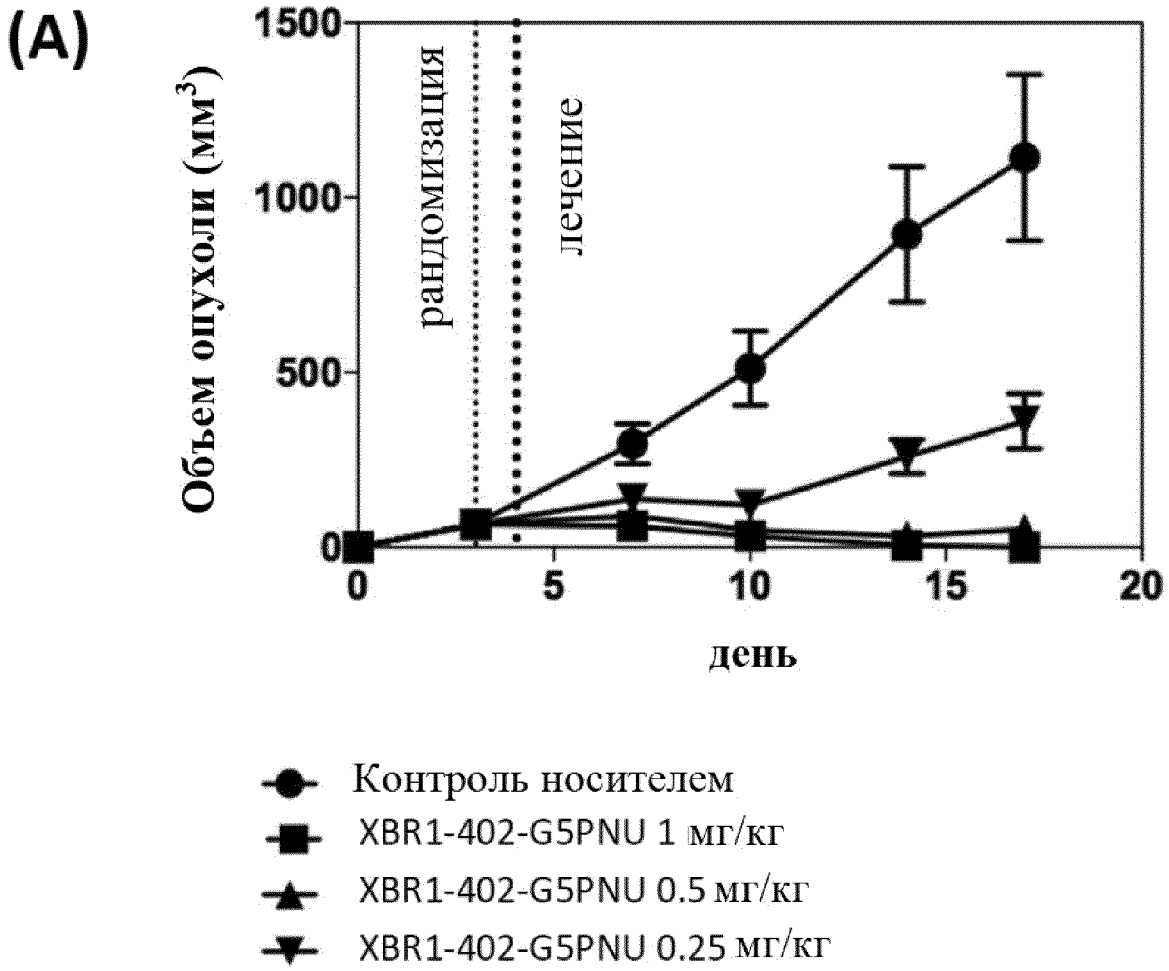
G5-EDA-PNU



ФИГУРА 1

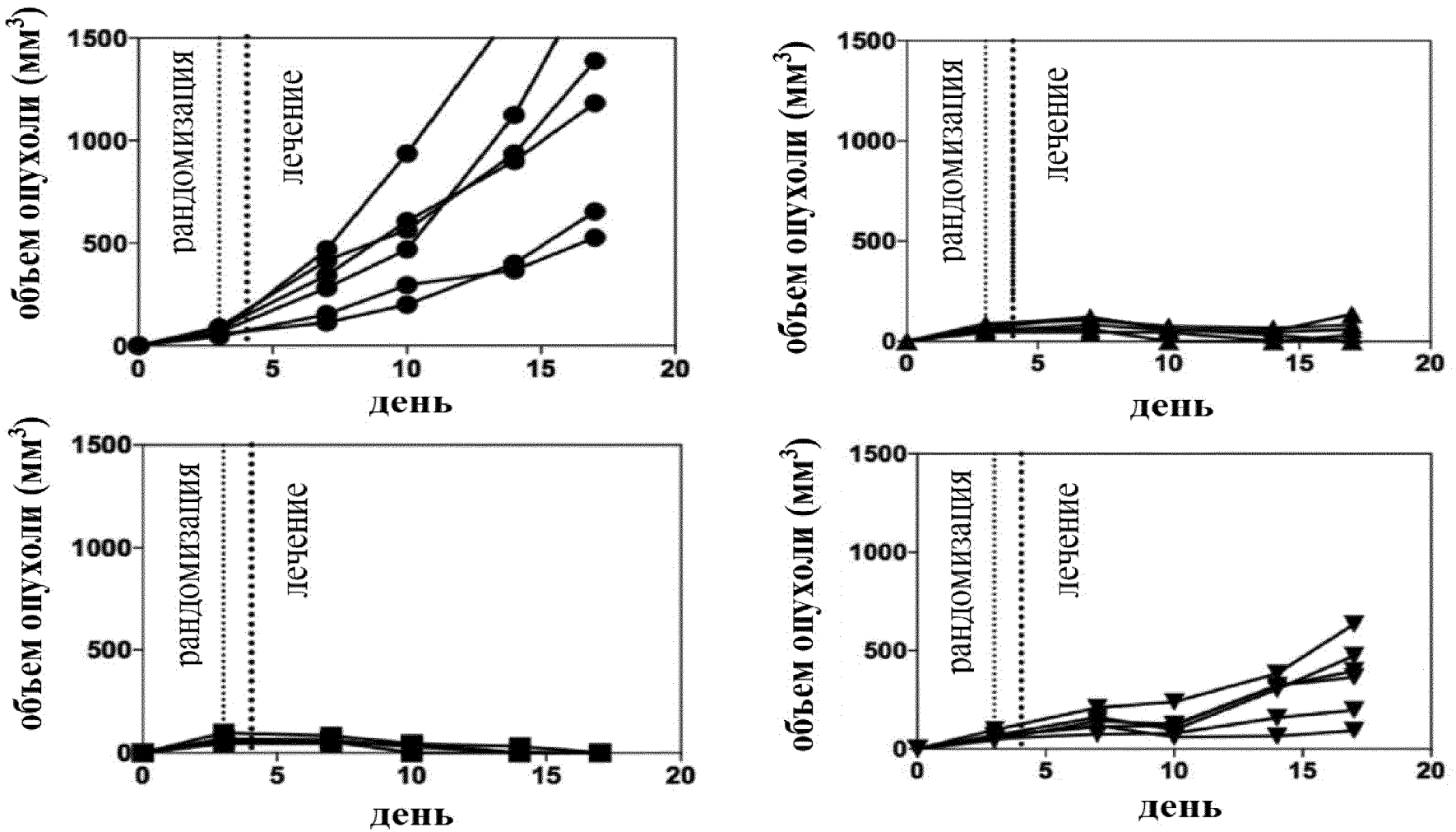

100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
анти- ROR1 (2A2)
контроль
FL2-H :: антитело к IgG-PE человека

ФИГУРА 2

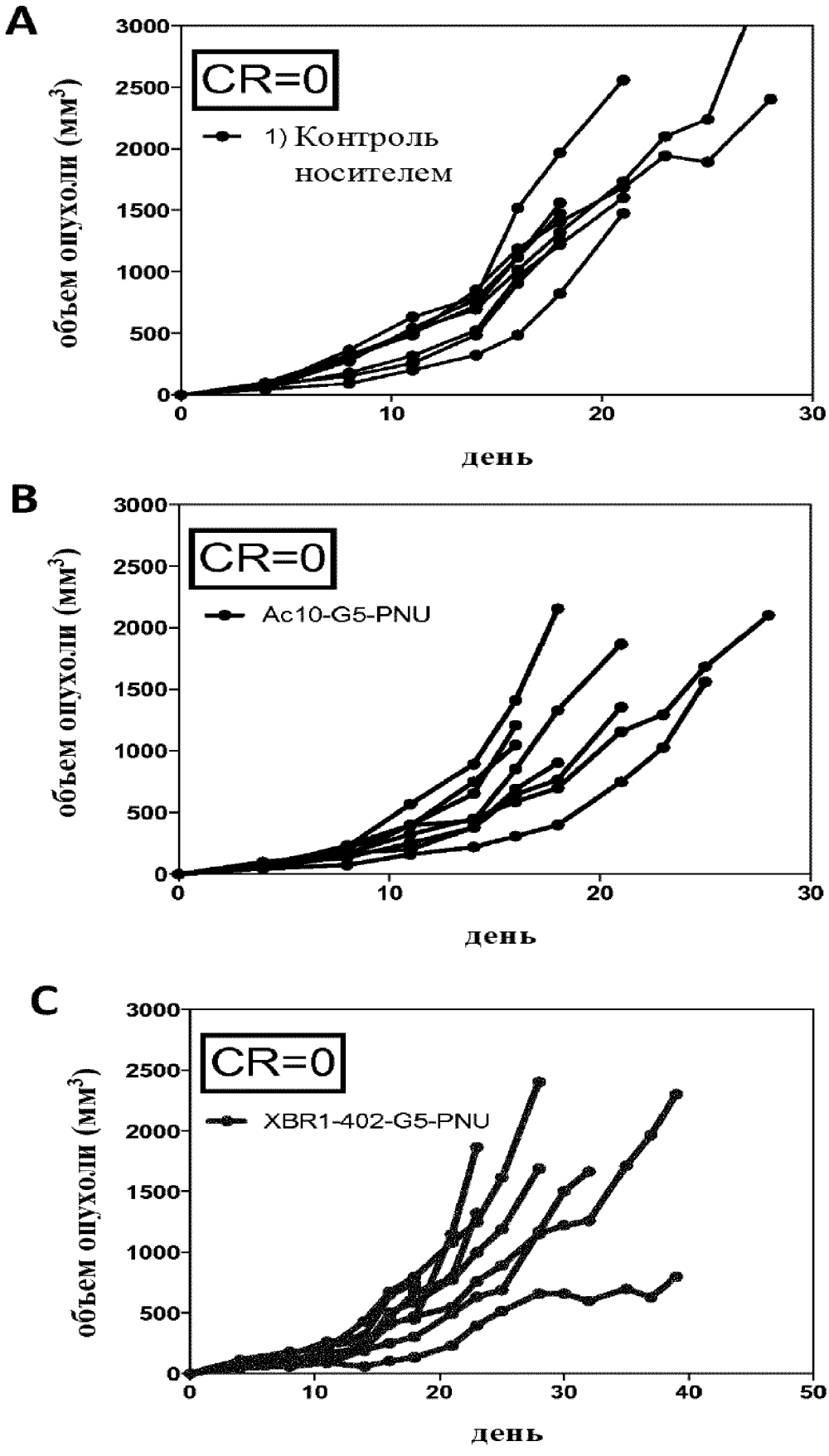

(A)
Объем опухоли (мм3)
1500
1000
500
0
рандомизация
лечение
0
5
10
15
20
день
Контроль носителем
XBR1-402-G5PNU 1 мг/кг
XBR1-402-G5PNU 0.5 мг/кг
XBR1-402-G5PNU 0.25 мг/кг

ФИГУРА 3

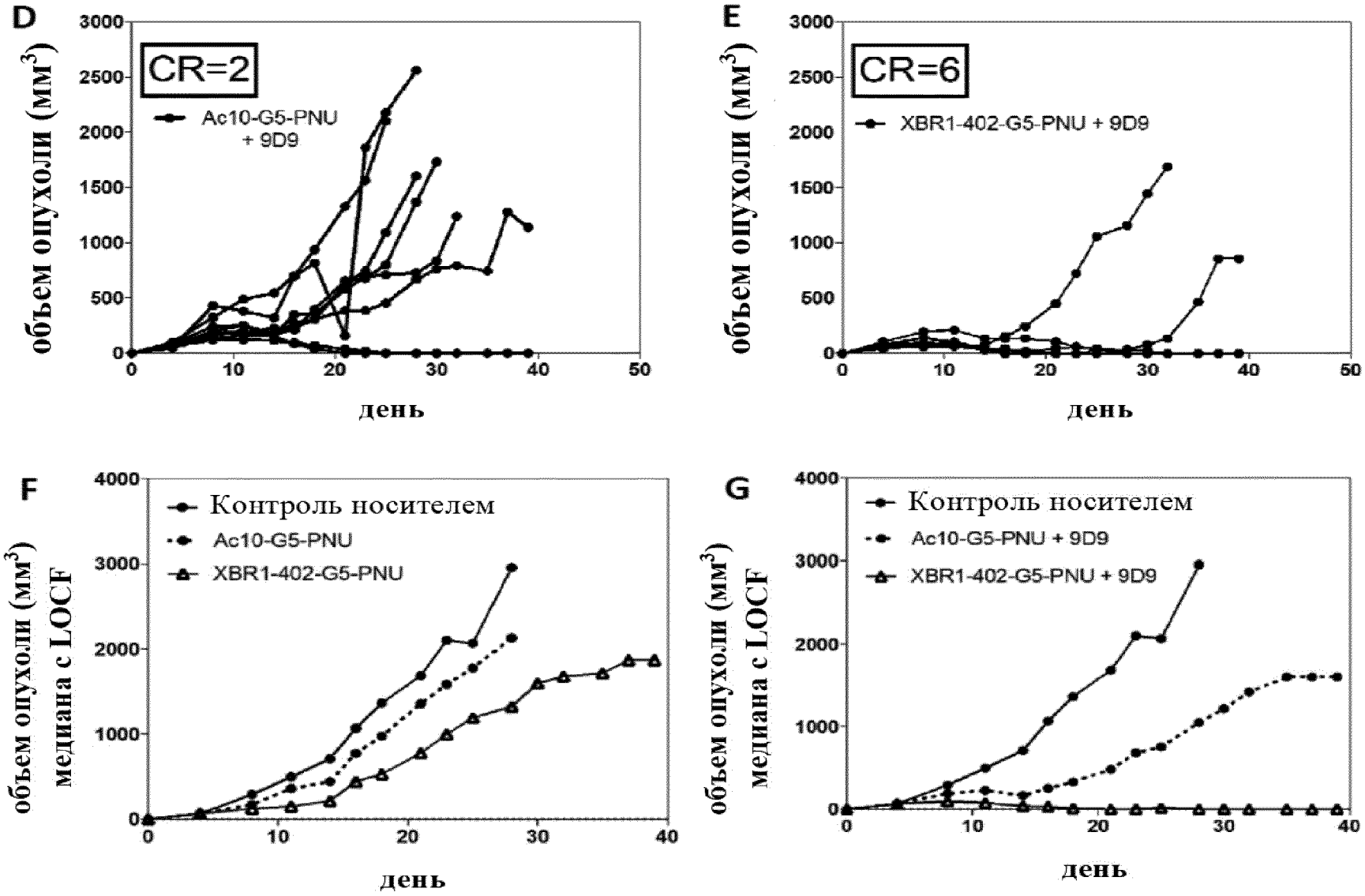
(B)



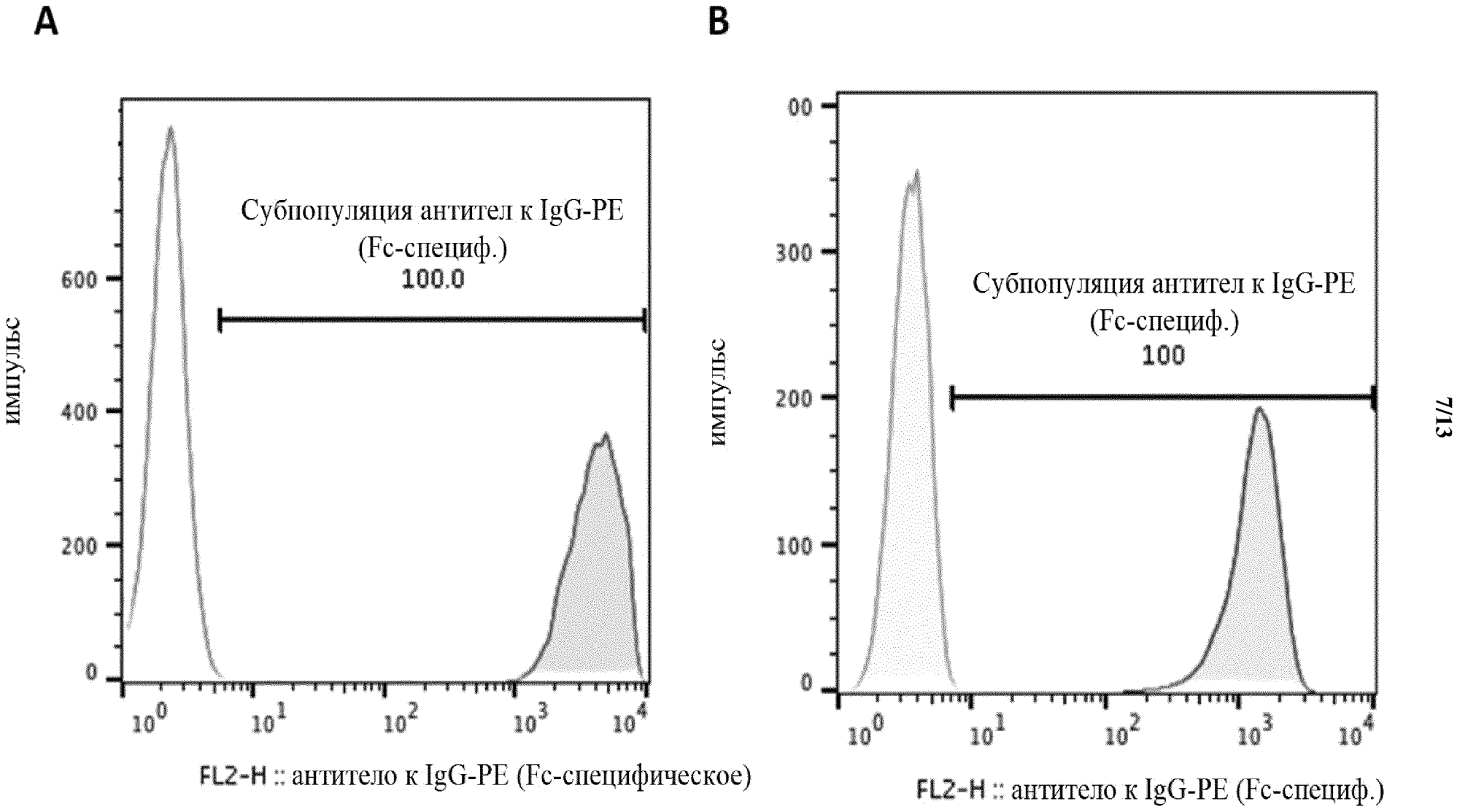
ФИГУРА 3 (продолжение)


A
CR=0
1) Контроль носителем
объем опухоли (мм3)
день
B
CR=0
Ac10-G5-PNU
объем опухоли (мм3)
день
C
CR=0
XBR1-402-G5-PNU
объем опухоли (мм3)
день

ФИГУРА 4

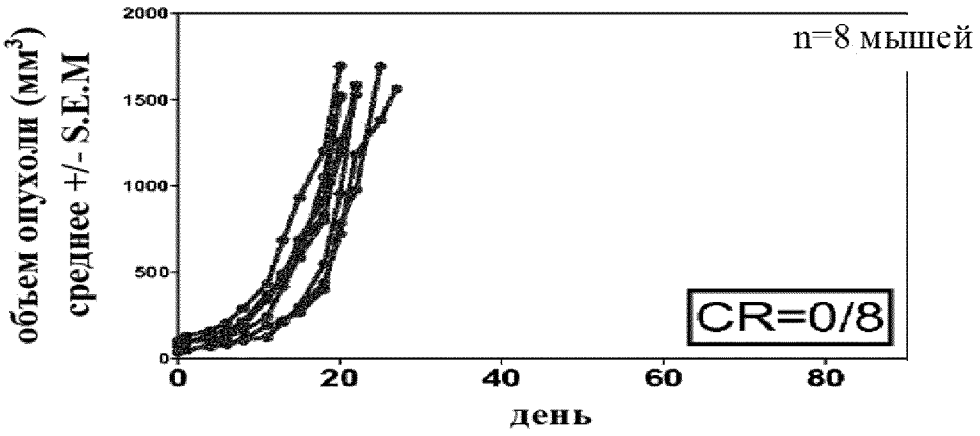


ФИГУРА 4 (продолжение)


A
импульс
600
400
200
0
Субпопуляция антител к IgG-PE
(Fc-специф.)
100.0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H :: антитело к IgG-PE (Fc-специфическое)
B
импульс
300
200
100
0
Субпопуляция антител к IgG-PE
(Fc-специф.)
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H :: антитело к IgG-PE (Fc-специф.)

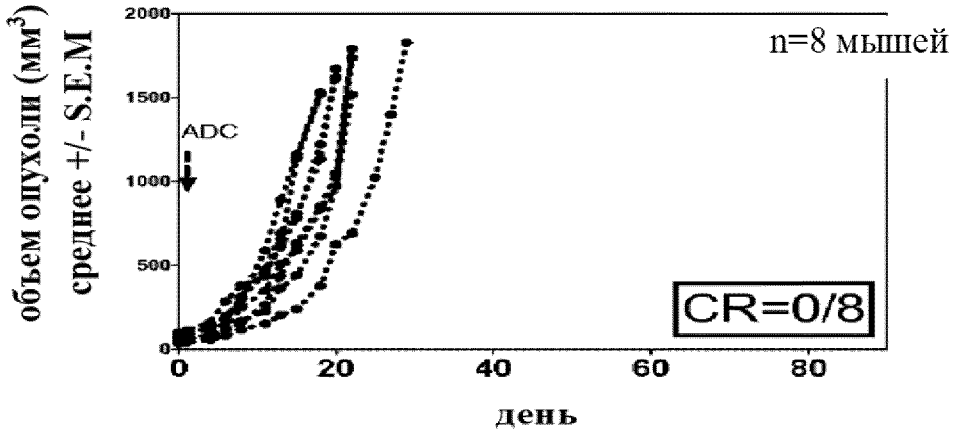
ФИГУРА 5

A



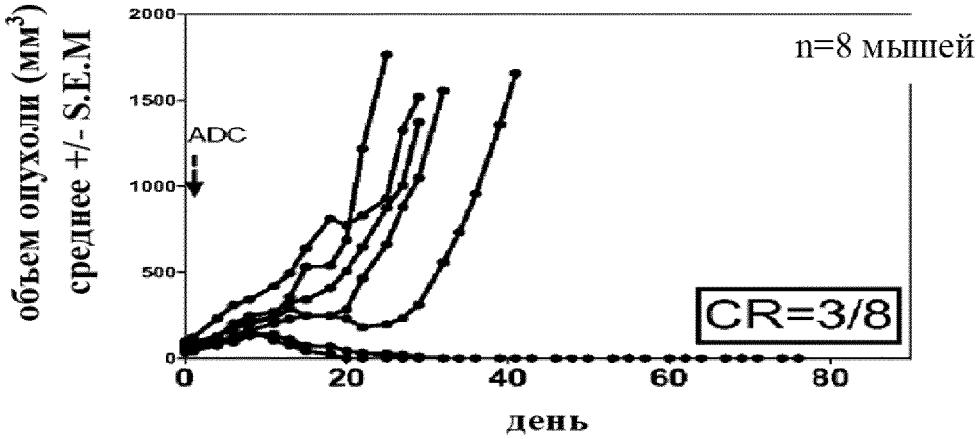
1) Контроль носителем

B



2) Ac10-G3-PNU (изотипический контроль)

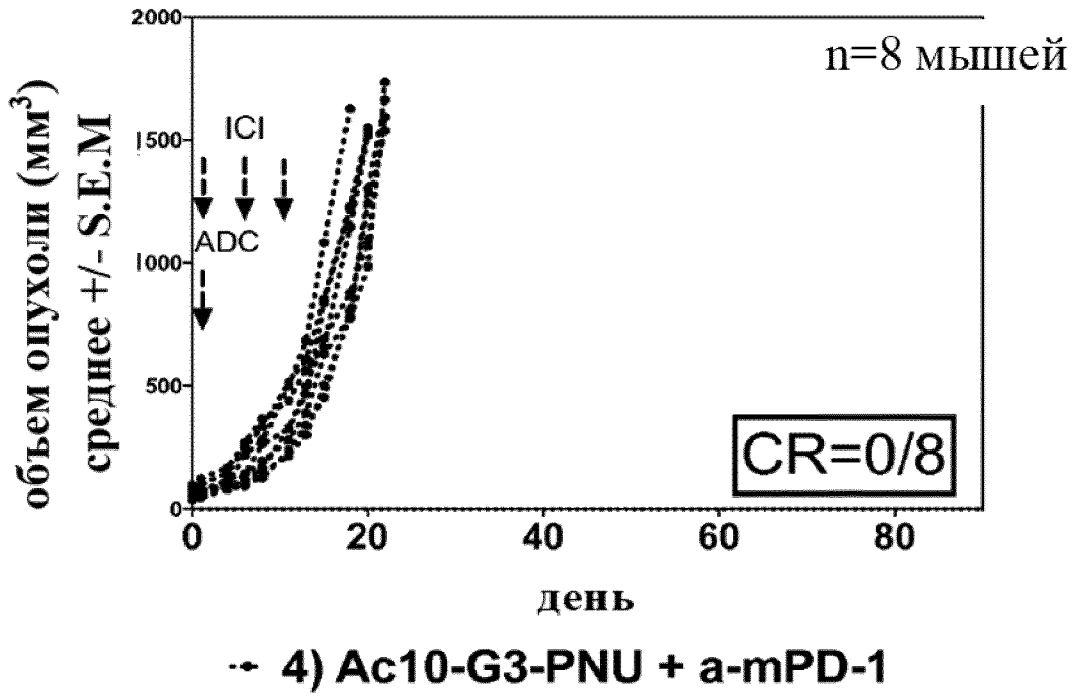
C



3) huXBR1-402-17-G3-PNU

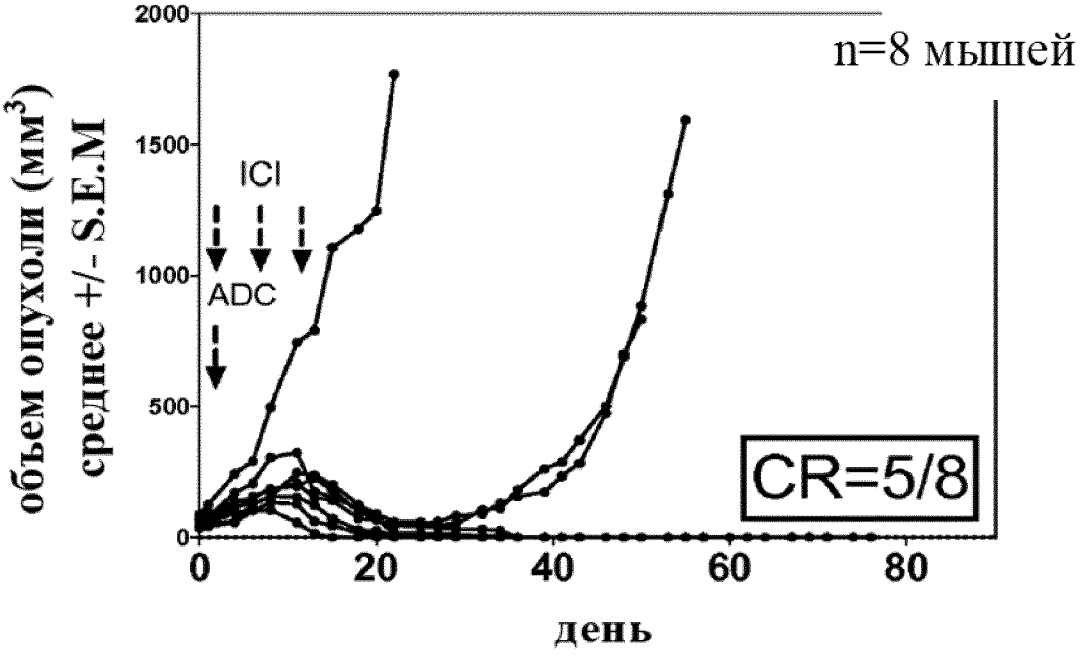
ФИГУРА 6

D



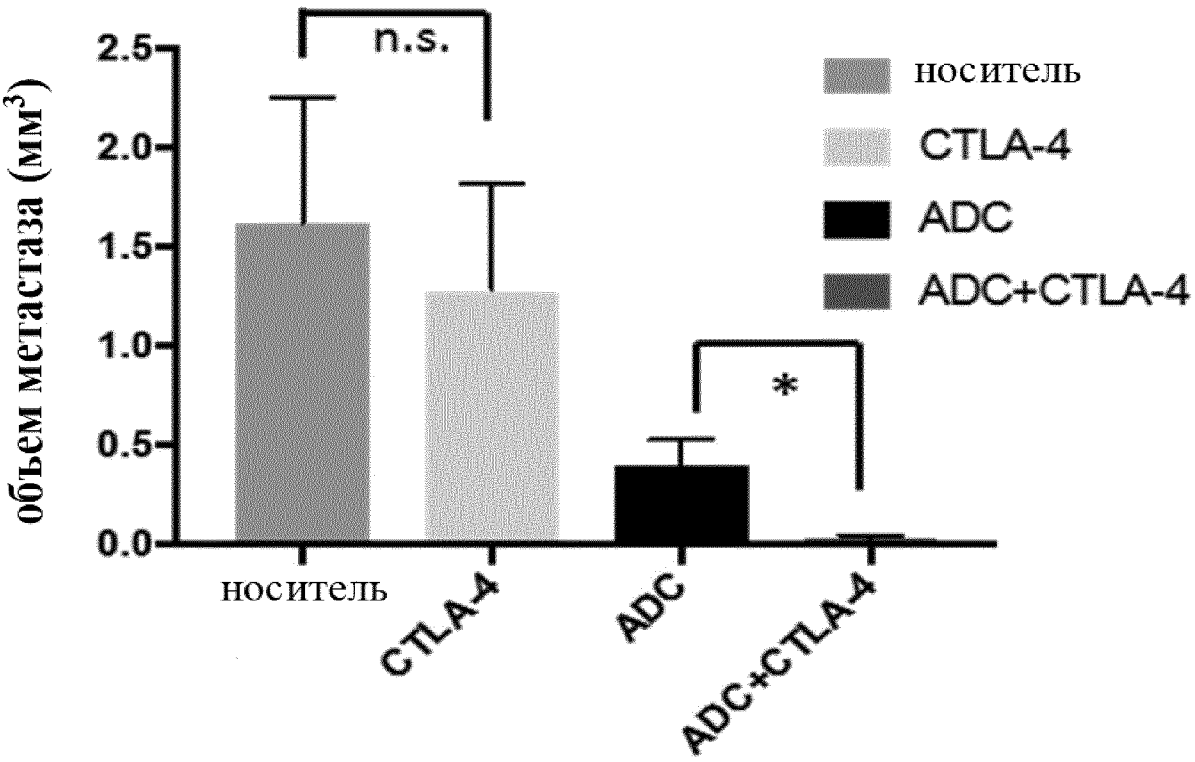
4) Ac10-G3-PNU + a-mPD-1

E



7) huXBR1-402-17-G3-PNU + a-mPD-1

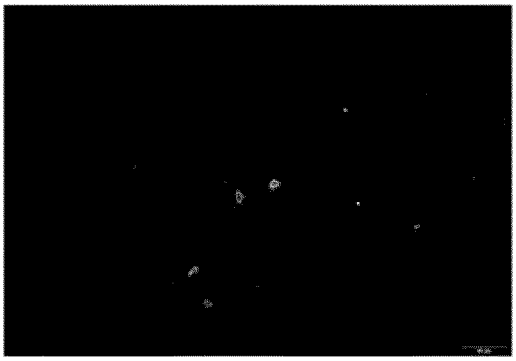
ФИГУРА 6 (продолжение)


объем метастаза (мм3)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
n.s.
*
носитель
CTLA-4
ADC
ADC+CTLA-4
носитель
CTLA-4
ADC
ADC+CTLA-4

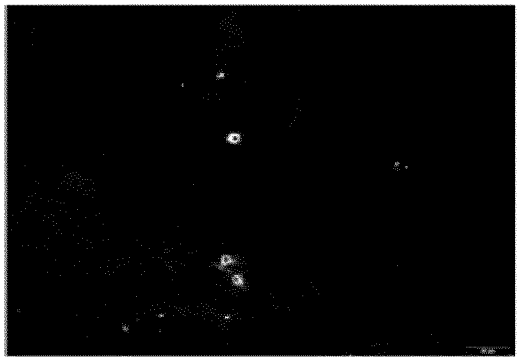
ФИГУРА 7

A

Не получивший лечение контроль, мышь 1



CD4

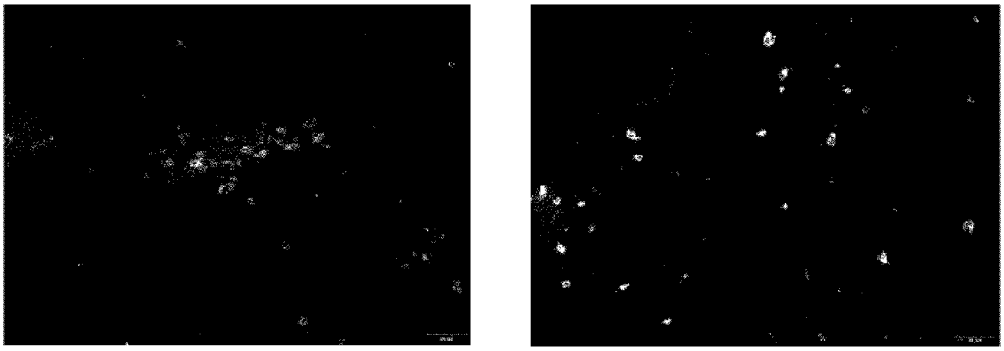


CD8

ФИГУРА 8

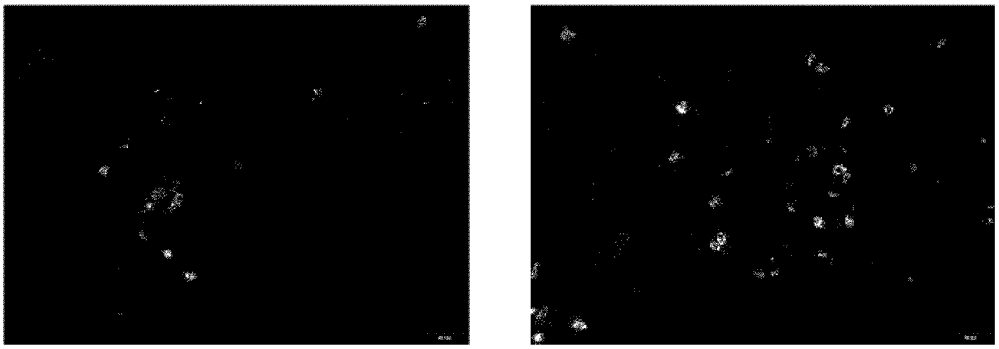
B

Группа лечения, мышь 1



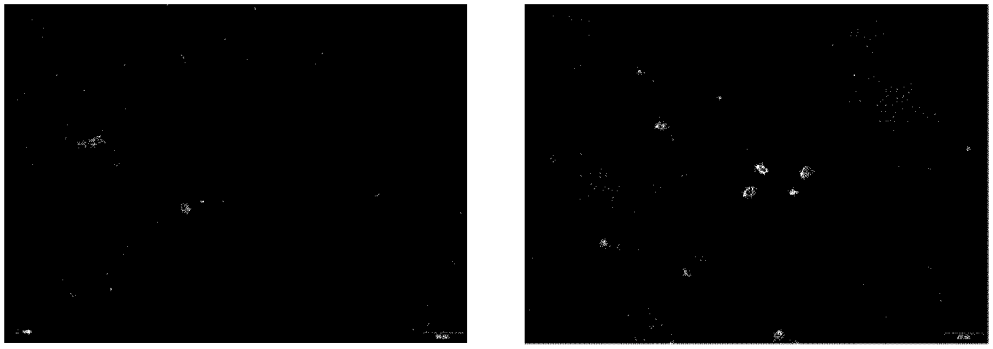
CD4 CD8

Группа лечения, мышь 2



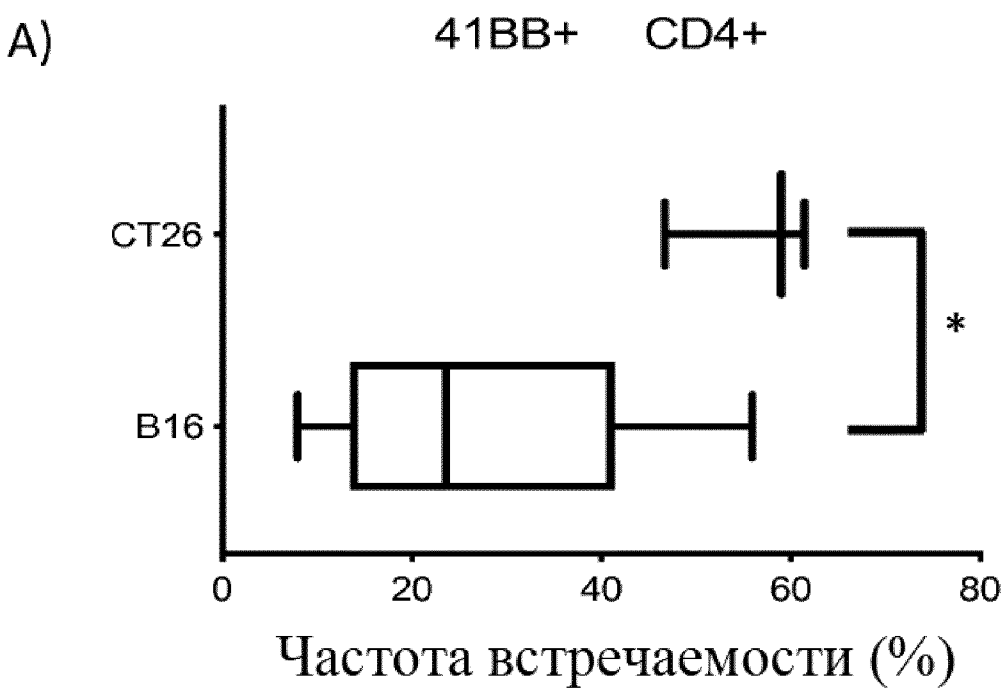
CD4 CD8

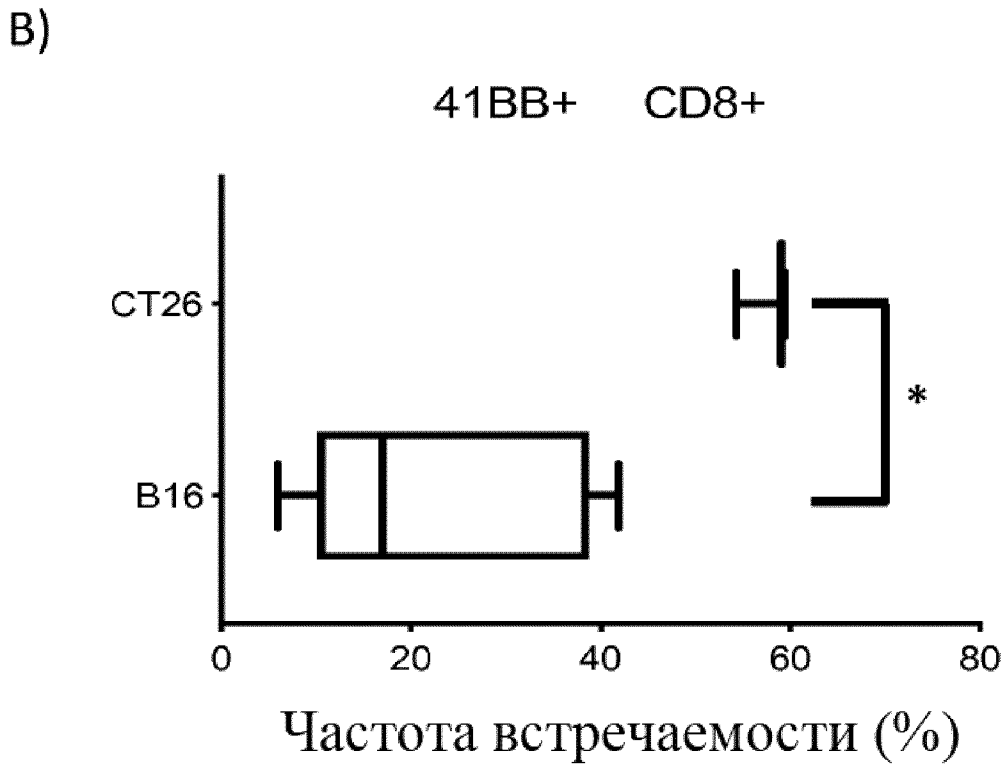
Группа лечения, мышь 3



CD4 CD8

ФИГУРА 8 (продолжение)


A)
41BB+ CD4+
CT26
B16
*
0
20
40
60
80
Частота встречаемости (%)


B)
41BB+ CD8+
CT26
B16
*
0
20
40
60
80
Частота встречаемости (%)

ФИГУРА 9