

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391379 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.21

(22) Дата подачи заявки
2021.11.05

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ КОНЬЮГАТОМ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННЫЙ
ПРЕПАРАТ С ИНГИБИТОРОМ ИММУННЫХ КЛЕТОК

(31) 63/111,045; 63/172,411; 63/208,179

(32) 2020.11.08; 2021.04.08; 2021.06.08

(33) US

(86) PCT/US2021/058208

(87) WO 2022/098972 2022.05.12

(71) Заявитель:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Гардай Шира, Смит Элисон,
Клюссман Керри, Лю Бернارد, Ван
Эппс Хизер (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предложены способы лечения рака с помощью антитела, которое связывает активатор иммунных клеток, в комбинации с конъюгатом антитело-лекарственное средство.

A1

202391379

202391379

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577928EA/085

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ КОНЬЮГАТОМ АНТИТЕЛО- ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ С ИНГИБИТОРОМ ИММУННЫХ КЛЕТОК ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/111 045, поданной 8 ноября 2020 г., предварительной заявки США № 63/172 411, поданной 8 апреля 2021 г. и предварительной заявки США № 63/208 179, поданной 8 июня, 2021 г., каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки для любых целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] В данном документе предложены способы лечения рака с помощью антитела, которое связывает активатор иммунных клеток, в комбинации с конъюгатом антитело-лекарственное средство.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Иммуноонкологические терапевтические средства и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) использовались для лечения рака у пациентов. Ни один из классов терапевтических средств не был в состоянии лечить полный набор пациентов по целевым показаниям. Данное изобретение решает эту и другие проблемы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Вариант осуществления 1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с раком (1) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), который содержит первое антитело, которое связывает опухолеассоциированный антиген, и цитотоксический агент, причем цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина; и (2) второе антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, при этом второе антитело содержит Fc с повышенным связыванием с одним или более активирующими FcγR, при этом активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI.

[0005] Вариант осуществления 2. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa.

[0006] Вариант осуществления 3. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRIIa.

[0007] Вариант осуществления 4. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRI.

[0008] Вариант осуществления 5. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с FcγRIIIa, FcγRIIa и FcγRI.

[0009] Вариант осуществления 6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR.

[0010] Вариант осуществления 7. Способ по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIIb.

[0011] Вариант осуществления 8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженные уровни фукозы и/или был сконструирован таким образом, чтобы он содержал одну или более мутаций, в результате чего Fc обладает усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR.

[0012] Вариант осуществления 9. Способ по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что второе антитело является нефукозилированным.

[0013] Вариант осуществления 10. Способ по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что второе антитело содержит замены S293D, A330L и I332E в константной области тяжелой цепи.

[0014] Вариант осуществления 11. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с раком конъюгата антитело-лекарственное средство, причем конъюгат антитело-лекарственное средство содержит первое антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, при этом цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина; и второе антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, при этом второе антитело является нефукозилированным.

[0015] Вариант осуществления 12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, отличающийся тем, что первое антитело связывает опухолеассоциированный антиген.

[0016] Вариант осуществления 13. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с раком (1) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), причем ADC содержит первое антитело, которое связывает опухолеассоциированный антиген, и цитотоксический агент, причем цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина и (2) второе антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, при этом второе антитело содержит Fc с усиленной активностью ADCC по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа.

[0017] Вариант осуществления 14. Способ по варианту осуществления 13, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленной активностью ADCC и ADCP по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа.

[0018] Вариант осуществления 15. Способ по варианту осуществления 13 или 14, отличающийся тем, что второе антитело является нефукозилированным.

[0019] Вариант осуществления 16. Способ по любому из вариантов осуществления 13-15, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR, при этом активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI.

[0020] Вариант осуществления 17. Способ по варианту осуществления 16,

отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa.

[0021] Вариант осуществления 18. Способ по варианту осуществления 16, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRIIa.

[0022] Вариант осуществления 19. Способ по варианту осуществления 16, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRI.

[0023] Вариант осуществления 20. Способ по варианту осуществления 16, отличающийся тем, что второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с FcγRIIIa, FcγRIIa и FcγRI.

[0024] Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 13-20, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR.

[0025] Вариант осуществления 22. Способ по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIb.

[0026] Вариант осуществления 23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, отличающийся тем, что первое антитело связывает антиген, выбранный из 5T4 (TPBG), ADAM-9, AG-7, ALK, ALP, AMHRII, APLP2, ASCT2, AVB6, AXL (UFO), B7-H3 (CD276), B7-H4, BCMA, C3a, C3b, C4.4a (LYPD3), C5, C5a, CA6, CA9, CanAg, карбоангидразы IX (CAIX), катепсина D, CCR7, CD1, CD10, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD111, CD112, CD113, CD116, CD117, CD118, CD119, CD11A, CD11b, CD11c, CD120a, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD13, CD130, CD131, CD132, CD133, CD135, CD136, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD146, CD147, CD148, CD15, CD150, CD151, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b2, CD158e, CD158f1, CD158h, CD158i, CD159a, CD16, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD166, CD167b, CD169, CD16a, CD16b, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD18, CD180, CD181, CD183, CD184, CD185, CD19, CD194, CD197, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD20, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD208, CD21, CD213a1, CD213a2, CD217, CD218a, CD22, CD220, CD221, CD222, CD224, CD226, CD228, CD229, CD23, CD230, CD232, CD239, CD243, CD244, CD248, CD249, CD25, CD26, CD265, CD267, CD269, CD27, CD272, CD273, CD274, CD275, CD279, CD28, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD289, CD29, CD294, CD295, CD298, CD3, CD3 эпсилон, CD30, CD300f, CD302, CD304, CD305, CD307, CD31, CD312, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD32, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD32b, CD33, CD331, CD332, CD333, CD334, CD337, CD339, CD34, CD340, CD344, CD35, CD352, CD36, CD37, CD38, CD39, CD3d, CD3g, CD4, CD41, CD42d, CD44, CD44v6, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD5, CD50, CD51, CD51 (интегрин альфа-V), CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD6, CD61, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD66a-e,

CD67, CD68, CD69, CD7, CD70, CD70L, CD71, CD71 (TfR), CD72, CD73, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD82, CD83, CD84, CD85f, CD85i, CD85j, CD86, CD87, CD89, CD90, CD91, CD92, CD95, CD96, CD97, CD98, CDH6, CDH6 (кадгерина 6), CDw210a, CDw210b, CEA, CEACAM5, CEACAM6, CFC1B, cKIT, CLDN18.2 (клаудин 18.2), CLDN6, CLDN9, CLL-1, c-MET, факторов комплемента C3, Cripto, CSP-1, CXCR5, DCLK1, DLK-1, DLL3, DPEP3, DR5 (рецептора смерти 5), дисадгерина, EFNA4, EGFR, EGFR дикого типа, EGFRviii, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, EMP2, ENPP3, EpCAM, EphA2, EphA3, эфрина-A4 (EFNA4), ETBR, FAP, FcRH5, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR, FOLR1, FOLR-альфа, FSH, GCC, GD2, GD3, Globo H, GPC1, GPC-1, GPC3, GPNMB, GPR20, HER2, HER-2, HER3, HER-3, HGFR (c-Met), HLA-DR, HM1.24, HSP90, Ia, IGF-1R, IL-13R, IL-15, IL1RAP, IL-2, IL-3, IL-4, IL7R, интегрин альфаVбета 3 (интегрин $\alpha V\beta 3$), интегрин бета-6, рецептор интерлейкина-4 (IL4R), KAAG-1, KLK2, LAMP-1, Le(y), антигена Льюиса Y, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH, липидного рафта, LIV-1 (SLC39A6 или ZIP6), LRP-1, LRRC15, LY6E, рецептора маннозы макрофага 1, MAGE, мезотелина (MSLN), MET, белка A, родственного цепи МНС класса I, и B (MICA и MICB), MN/CA IX, MRC2, MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC1, MUC16, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC5ac, NaPi2b, NCA-90, NCA-95, нектин-4, Notch3, нуклеолина, OAcGD2, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), OX001L, P1GF, антигена PAM4, p-кадгерина (кадгерин 3), PD-L1, фосфатидилсерина (PS), PRLR, рецептора пролактина (PRLR), белков псевдомонад, PSMA, PTK4, PTK7, рецепторной тирозинкиназы (RTK), RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SEZ6, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, SLMAMF7 (CS1), SLTRK6, сортилина (SORT1), SSEA-4, SSTR2, Staphylococcus aureus (антибиотика), STEAP-1, STING, STn, T101, TAA, TAC, TDGF1, тенасцина, TENB2, TGF- β , антигенов Томсона-Фриденрайха, Thy1.1, TIM-1, тканевого фактора (TF; CD142), TM4SF1, антигена Tn, ФНО-альфа (ФНО α), TRA-1-60, рецептора TRAIL (R1 и R2), TROP-2, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), uPAR, VEGFR, VEGFR-2 и xCT.

[0027] Вариант осуществления 24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, отличающийся тем, что первое антитело не связывает нектин-4.

[0028] Вариант осуществления 25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-24, отличающийся тем, что не включает введение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело, которое связывает нектин-4.

[0029] Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, отличающийся тем, что первое антитело связывает антиген, выбранный из CD71, Ax1, AMHRII и LGR5, Ax1, CA9, CD142, CD20, CD22, CD228, CD248, CD30, CD33, CD37, CD48, CD7, CD71, CD79b, CLDN18.2, CLDN6, c-MET, EGFR, EphA2, ETBR, FCRH5, GCC, Globo H, gpNMB, HER-2, IL7R, интегрин бета-6, KAAG-1, LGR5, LIV-1, LRRC15, Ly6E, мезотелина (MSLN), MET, MRC2, MUC16, NaPi2b, нектин-4, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), PSMA, ROR1, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, STEAP-1, STn, TIM-1, TRA-1-60 и опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72).

[0030] Вариант осуществления 27. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, отличающийся тем, что первое антитело связывает антиген, выбранный из BCMA,

GPC1, CD30, cMET, SAIL, HER3, CD70, CD46, CD48, HER2, 5T4, ENPP3, CD19, EGFR и EphA2.

[0031] Вариант осуществления 28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, отличающийся тем, что первое антитело связывает антиген, выбранный из Her2, TROP2, BCMA, cMet, интегрин альфаVбета6 (интегрин $\alpha V\beta 6$), CD22, CD79b, CD30, CD19, CD70, CD228, CD47 и CD48.

[0032] Вариант осуществления 29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, отличающийся тем, что первое антитело связывает антиген, выбранный из CD142, интегрин бета-6, интегрин альфаVбета6, ENPP3, CD19, Ly6E, cMET, C4.4a, CD37, MUC16, STEAP-1, LRRC15, SLITRK6, ETBR, FCRH5, Axl, EGFR, CD79b, BCMA, CD70, PSMA, CD79b, CD228, CD48, LIV-1, EphA2, SLC44A4, CD30 и sTn.

[0033] Вариант осуществления 30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, отличающийся тем, что разрушителем тубулина является ауристин, тубулизин, колхицин, алкалоид барвинка, таксан, криптофицин, майтансиноид или гемаистерлин.

[0034] Вариант осуществления 31. Способ по варианту осуществления 30, отличающийся тем, что разрушителем тубулина является ауристин.

[0035] Вариант осуществления 32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, отличающийся тем, что разрушителем тубулина является долостатин-10, MMAE (N-метилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-норэфедрин), MMAF (N-метилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин), ауристин F, AEB, AEBV или AFP (ауристин фенилаланин фенилендиамин).

[0036] Вариант осуществления 33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, отличающийся тем, что разрушителем тубулина является MMAE.

[0037] Вариант осуществления 33-1. Способ по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство содержит MMAE и выбран из: DP303с, также известного как SYSA1501, нацеленного на HER-2 (CSPC Pharmaceutical; Dophen Biomed), SIA01-ADC, также известного как ST1, нацеленного на STn (Siamab Therapeutics), ладиратузумаба ведотина, также известного как SGN-LIV1A, нацеленного на LIV-1 (Merck & Co., Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ABBV-085, также известного как самротамаб ведотин, нацеленного на LRRC15 (Abbvie; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), DMOT4039A, также известного как RG7600; α MSLN-MMAE, нацеленного на мезотелин (MSLN) (Roche-Genentech), RC68, также известного как Remegen EGFR ADC, нацеленного на EGFR (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.)), RC108, также известного как RC108-ADC, нацеленного на c-MET (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.)), CMG901, также известного как MRG005, нацеленного на CLDN18.2 (Keymed Biosciences; Lepu biotech; Shanghai Miracogen Inc. (Shanghai Meiya Biotechnology Co., Ltd)), YBL-001, также известного как LCB67, нацеленного на DLK-1 (Lego Chem Biosciences; Pyxis Oncology; Y-Biologics), DCDS0780A, также известного как иладатузумаб ведотин; RG7986, нацеленного на CD79b (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), тизотумаба ведотина, также известного как Humax-TF-ADC; tf-011-mmae;

TIVDAK™, нацеленного на CD142 (GenMab; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), GO-3D1-ADC, также известного как humAb-3D1-MMAE ADC, нацеленного на MUC1-C (Genus Oncology LLC), ALT-P7, также известного как HM2-MMAE, нацеленного на HER-2 (Alteogen, Inc.; Levena Biopharma; 3SBio, Inc.), вандортузумаба ведотина, также известного как DSTP3086S; RG7450, нацеленного на STEAP-1 (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), лифастузумаба ведотина, также известного как DNIB0600A; NaPi2b ADC; RG7599, нацеленного на NaPi2b (Roche-Genentech), софитузумаба ведотина, также известного как DMUC5754A; RG7458, нацеленного на MUC16 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Roche-Genentech), RG7841, также известного как DLYE5953A, нацеленного на Ly6E (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), RG7598, также известного как DFRF4539A, нацеленного на FCRH5 (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), RG7636, также известного как DEDN6526A, нацеленного на ETBR (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Roche-Genentech), пинатузумаба ведотина, также известного как DCDT2980S; RG7593, нацеленного на CD22 (Roche-Genentech), полатузумаба ведотина, также известного как DCDS4501A; POLIVY™; RG7596; RO-5541077, нацеленного на CD79b (Chugai Pharmaceutical; Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), DMUC4064A, также известного как D-4064a; RG7882, нацеленного на MUC16 (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), SYSA1801, также известного как CPO102, нацеленного на CLDN18.2 (Conjupro Biotherapeutics Inc.; CSPC ZhongQi Pharmaceutical Technology Co.), RC118, также известного как Claudin18.2- ADC; YH005, нацеленного на CLDN18.2 (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.); Biocytogen), VLS-101, также известного как цирмтузумаб ведотин; МК-2140; UC-961ADC3; зиловертамаба ведотина, нацеленного на ROR1 (VelosBio. Inc), глембатумумаба ведотина, также известного как CDX-011; CR011-vcMMAE, нацеленного на gpNMB (Celldex Therapeutics), BA3021, также известного как CAB-ROR2-ADC; озурифтамаба ведотина, нацеленного на ROR2 (Bioatla; Himalaya Therapeutics), BA3011, также известного как CAB-AXL-ADC; мекботамаба ведотина, нацеленного на Axl (Bioatla; Himalaya Therapeutics), CM-09, также известного как бстронгксимаб-ADC, нацеленного на TRA-1-60 (CureMeta), ABBV-838, также известного как азинтуксизумаб ведотин, нацеленного на SLAMF7 (Abbvie), энапотатамаба ведотина, также известного как AXL-107-MMAE; HuMax-AXL-ADC, нацеленного на Axl (GenMab; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ARC-01, также известного как анти-CD79b ADC, нацеленного на CD79b (Araris Biotech AG), дизитамаба ведотина, также известного как Aidexi®; RC48, нацеленного на HER-2 (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.); Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ASG-5ME, также известного как AGS-5; AGS-5ME, нацеленного на SLC44A4 (Agensys, Inc.; Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), энфортумаба ведотина, также известного как AGS-22M6E; ASG-22CE; ASG-22ME; PADCEV™, нацеленного на Nectin-4 (Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ASG-15ME, также известного как AGS-15E; сиртратумаба ведотина, нацеленного на SLITRK6 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Astellas Pharma Inc.), брентуксимаба ведотина, также известного как адсетрис; cAC10-vcMMAE; SGN-35, нацеленного на CD30 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.;

Takeda), телизотузимаба ведотина, также известного как ABBV-399, нацеленного на с-MET (Abbvie), лосатуксизумаба ведотина, также известного как ABBV-221, нацеленного на EGFR (Abbvie), CX-2029, также известного как ABBV-2029, нацеленного на CD71 (Abbvie; CytomX Therapeutics), АВ-3А4-ADC, также известного как АВ-3А4-vcMMAE, нацеленного на КААG-1 (Alethia Biotherapeutics), индусатумаба ведотина, также известного как 5F9-vcMMAE; MLN0264; TAK-264, нацеленного на GCC (Takeda; Millennium Pharmaceuticals, Inc), FOR46 нацеленного на CD46 (Fortis Therapeutics, Inc.), LR004-VC-MMAE нацеленного на EGFR (Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College Hospital), CD30-ADC нацеленных на CD30 (NBE Therapeutics; Boehringer Ingelheim), антиэндосиалина-МС-VC-РАВС-MMAE нацеленного на CD248 (Genzyme), OBI-998 нацеленного на SSEA-4 (OBI Pharma), MRG002 нацеленного на HER-2 (Lepu biotech; Shanghai Miracogen Inc. (Shanghai Meiya Biotechnology Co., Ltd)), TRS005 нацеленного на CD20 (Teruisi Pharmaceuticals), Oba01 нацеленного на DR5 (рецептор смерти 5) (Obio Technology (Shanghai) Corp.,Ltd.; Yantai Obioadc Biomedical Technology Ltd.), PSMA ADC нацеленного на PSMA (Progenics Pharmaceuticals, Inc; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), SGN-CD48A нацеленного на CD48 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), IMAB362-vcMMAE нацеленного на CLDN18.2 (Astellas Pharma Inc.; Ganymed), GB251 нацеленного на HER-2 (Genor Biopharma Co., Ltd.), Innate Pharma BTG-ADC нацеленных на CD30 (Innate Pharma; Sanofi), ADCendo uPARAP ADC нацеленного на MRC2 (ADCendo), XCN-010 нацеленного на actM (Xiconic Pharmaceuticals, LLC), ANT-043 нацеленного на HER-2 (Antikor Biopharma), OBI-999 нацеленного на Globo H (Abzena; OBI Pharma), LY3343544 нацеленного на MET (Eli Lilly and Company), анти-TAG72 ADC Tagworks нацеленного на TAG-72 (Tagworks Pharmaceuticals), IMAB027-vcMMAE нацеленного на CLDN6 (Ganymed; Astellas Pharma Inc.), LGR5-ADC нацеленного на LGR5 (Genentech, Inc.), Philochem B12-MMAE ADC нацеленного на IL-7R (Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes; Philochem AG), TE-1522 нацеленного на CD19 (Immunwork), SGN-STNV нацеленного на STn (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), HTI-1511 нацеленного на EGFR (Abzena; Halozyme Therapeutics), Peptron PAb001-ADC нацеленного на OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1) (Peptron; Qilu Pharmaceutical co. Ltd.), LM-102 нацеленного на CLDN18.2 (LaNova Medicines Limited), Anwita Biosciences MSLN-MMAE нацеленного на мезотелин (MSLN) (Anwita biosciences), SGN-CD228A нацеленного на CD228 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), NBT828 нацеленного на HER-2 (NewBio Therapeutics; Genor Biopharma Co., Ltd.), Gamamabs GM103 нацеленного на AMHR2 (GamaMabs Pharma; Exelixis), LCB14-0302 нацеленного на HER-2 (Lego Chem Biosciences), BAY79-4620 нацеленного на карбоангидразу IX (CAIX) (Bayer; MorphoSys), NBT508 нацеленного на CD79b (NewBio Therapeutics), PAT-DX3-MMAE нацеленного на Undisclosed (Patrys; Yale University), AGS67E нацеленного на CD37 (Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), CDX-014 нацеленного на TIM-1 (Celldex Therapeutics), BVX001 нацеленного на CD33; CD7 (Bivictrix therapeutics), SGN-B6A нацеленного на интегрин бета-6 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), MRG003 нацеленного на EGFR (Lepu biotech; Shanghai Miracogen Inc. (Shanghai Meiya Biotechnology Co., Ltd)) и

РУХ-202 нацеленного на DLK-1 (Puxis Oncology; Lego Chem Biosciences).

[0038] Вариант осуществления 34. Способ по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что MMAE конъюгирован с первым антителом через линкер, содержащим валин и цитруллин.

[0039] Вариант осуществления 35. Способ по варианту осуществления 34, отличающийся тем, что линкер-MMAE представляет собой vсMMAE.

[0040] Вариант осуществления 36. Способ по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что MMAE конъюгирован с первым антителом через линкер, содержащий лейцин, аланин и глутаминовую кислоту.

[0041] Вариант осуществления 37. Способ по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что линкер-MMAE представляет собой dLAE-MMAE.

[0042] Вариант осуществления 38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, отличающийся тем, что разрушителем тубулина является MMAF.

[0043] Вариант осуществления 38-1. Способ по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство содержит MMAF и выбран из: CD70-ADC нацеленного на CD70 (Kochi University; Osaka University), IGN786 нацеленного на SAIL (AstraZeneca; Igenica Biotherapeutics), PF-06263507 нацеленного на 5T4 (Pfizer), GPC1-ADC нацеленного на GPC-1 (Kochi University), ADC-AVP10 нацеленного на CD30 (Aviper), M290-MC-MMAF нацеленного на CD103 (The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University), BVX001 нацеленного на CD33; CD7 (Bivictrix therapeutics), Tanabe P3D12-vc-MMAF нацеленного на c-MET (Tanabe Research Laboratories), LILRB4-Targeting ADC нацеленного на LILRB4 (The University of Texas Health Science Center, Houston), TSD101, также известного как ABL201, нацеленного на BCMA (TSD Life Science; ABL Bio; Lego Chem Biosciences), депатуксизумаба мафодотина, также известного как ABT-414, нацеленного на EGFR (Abbvie; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), AGS16F, также известного как AGS-16C3F; AGS-16M8F, нацеленного на ENPP3 (Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), AVG-A11 BCMA ADC, также известного как AVG-A11-mcMMAF, нацеленного на BCMA (Avantgen), белантамаба мафодотина, также известного как BLENREP; GSK2857916; J6M0-mcMMAF, нацеленного на BCMA (GlaxoSmithKline; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), MP-HER3-ADC, также известного как HER3-ADC, нацеленного на HER-3 (MediaPharma), FS-1502, также известного как LCB14-0110, нацеленного на HER-2 (Lego Chem Biosciences; Shanghai Fosun Pharmaceutical Development Co, Ltd.), MEDI-547, также известного как MI-CP177, нацеленного на EphA2 (AstraZeneca; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), форсетузимаба мафодотина, также известного как SGN-75, нацеленного на CD70 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), денинтузимаба мафодотина, также известного как SGN-CD19A, нацеленного на CD19 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.) и HTI-1066, также известного как SHR-A1403, нацеленного на c-MET (Jiangsu HengRui Medicine Co., Ltd).

[0044] Вариант осуществления 39. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, отличающийся тем, что разрушителем тубулина является тубулизин.

[0045] Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 39, отличающийся тем, что тубулизин выбран из тубулизина D, тубулизина M, тубуфенилаланина и тубутирозина.

[0046] Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство выбран из AbGn-107 (Ab1-18Hr1), AGS62P1 (ASP1235), ALT-P7 (HM2-MMAE), BA3011 (CAB-AXL-ADC), белантамаба мафодотина, брентуксимаба ведотина, цирмтузумаба ведотина (VLS-101, UC-961ADC3), кофетузумаба пелидотина (PF-06647020, PTK7-ADC, PF-7020, ABBV-647), CX-2029 (ABBV-2029), диситамаба ведотина (RC48), энапотатамаба ведотина (HuMax-AXL-ADC, AXL-107-MMAE), энфортумаба ведотина (EV), FS-1502 (LCB14-0110), гемтузумаба озогамидина, HTI-1066 (SHR-A1403), инотузумаба озогамидина, PF-06804103 (NG-HER2 ADC), полатузумаба ведотина, сацитузумаба говитекана, SGN-B6A, SGN-CD228A, SGN-STNV, STI-6129 (CD38 ADC, LNDS1001, CD38-077 ADC), телисотузумаба ведотина (ABBV-399), тизотумаба ведотина (Humax-TF-ADC, tf-011-mmae, TV), трастузумаба дерукстекана, трастузумаба эмтанзина и ворсетузумаба мафодотина.

[0047] Вариант осуществления 42. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к клаудину-18.2, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 61-66.

[0048] Вариант осуществления 43. Способ по варианту осуществления 42, отличающийся тем, что антитело к клаудину-18.2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

[0049] Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что антитело к клаудину-18.2 представляет собой золбетуксимаб (175D10).

[0050] Вариант осуществления 45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к клаудину-18.2, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 69-74.

[0051] Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 45, отличающийся тем, что антитело к клаудину-18.2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

[0052] Вариант осуществления 47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к

PD-L1, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 77-82.

[0053] Вариант осуществления 48. Способ по варианту осуществления 47, отличающийся тем, что антитело к PD-L1 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

[0054] Вариант осуществления 49. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к ALP, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85-90.

[0055] Вариант осуществления 50. Способ по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что антитело к ALP содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

[0056] Вариант осуществления 51. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело включает антитело к B7H4, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 93-98.

[0057] Вариант осуществления 52. Способ по варианту осуществления 51, отличающийся тем, что антитело к B7H4 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

[0058] Вариант осуществления 53. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к HER2, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100.

[0059] Вариант осуществления 54. Способ по варианту осуществления 53, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой диситамаб ведотин.

[0060] Вариант осуществления 55. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к NaPi2B, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102.

[0061] Вариант осуществления 56. Способ по варианту осуществления 55,

отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой лифастузумаб ведотин.

[0062] Вариант осуществления 57. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к нектину-4, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 105-110.

[0063] Вариант осуществления 58. Способ по варианту осуществления 57, отличающийся тем, что антитело к нектину-4 представляет собой антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

[0064] Вариант осуществления 59. Способ по варианту осуществления 58, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой энфортумаб ведотин.

[0065] Вариант осуществления 60. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к AVB6, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 113-118.

[0066] Вариант осуществления 61. Способ по варианту осуществления 60, отличающийся тем, что антитело к AVB6 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112.

[0067] Вариант осуществления 62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к AVB6, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 121-126.

[0068] Вариант осуществления 63. Способ по варианту осуществления 62, отличающийся тем, что антитело к AVB6 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

[0069] Вариант осуществления 64. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к CD228, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 129-134.

[0070] Вариант осуществления 65. Способ по варианту осуществления 64, отличающийся тем, что антитело к CD228 содержит переменную область тяжелой цепи

(VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

[0071] Вариант осуществления 66. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к LIV-1, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 137-142.

[0072] Вариант осуществления 67. Способ по варианту осуществления 66, отличающийся тем, что антитело к LIV-1 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

[0073] Вариант осуществления 68. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что первое антитело представляет собой антитело к тканевому фактору, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 145-150.

[0074] Вариант осуществления 69. Способ по варианту осуществления 68, отличающийся тем, что антитело к тканевому фактору содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144.

[0075] Вариант осуществления 70. Способ по варианту осуществления 69, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой тизотумаб ведотин.

[0076] Вариант осуществления 71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-70, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело связывает активатор иммунных клеток, выбранный из рецептора антимюллерова гормона II (AMHR2), B7, B7H1, B7H2, B7H3, B7H4, BAFF-R, BCMA (антиген созревания В-клеток), Bst1/CD157, комплемента C5, хемокинового рецептора CC 4 (CCR4), CD123, CD137, CD19, CD20, CD25 (IL2RA), CD276, CD278, CD3, CD32, CD33, CD37, CD38, CD4 и HIV-1 сайтов связывания gp120, CD40, CD70, CD70 (член семейства лигандов рецептора ФНО), CD80, CD86, клаудина 18.2, c-MET, CSF1R, CTLA-4, EGFR, EGFR MET протоонкогена, ERHA3, ERBB2, ERBB3, FGFR2b, FLT3, GTR, глюкокортикоид-индуцированного рецептора ФНО (GTR), HER2, HER3, HLA, ICOS, IDO1, IFNAR1, IFNAR2, IGF-1R, IL-3Ральфа (CD123), IL-5R, IL-5Ральфа, LAG-3, протоонкогена MET, OX40 (CD134), PD-1, PD-L1, PD-L2, PVRIG, сильно гликозилированного муциноподобного домена гликопротеина (GP) EBOV респираторно-синцитиального вируса (RSV), резуса (Rh) D, иммуноглобулин-подобных лектинов 8, связывающих сиаловую кислоту (Siglec-8), сигнальной молекулы активации лимфоцитов (SLAMF7/CS1), антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами Т-

клеточного рецептора (CTLA4), TIGIT, TIM3 (HAVCR2), опухолеспецифического гликоэпитопа Muc1 (TA-Muc1), VSIR (VISTA) и VTCN1.

[0077] Вариант осуществления 72. Способ по любому из вариантов осуществления 1-71, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело связывает TIGIT.

[0078] Вариант осуществления 73. Способ по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что второе антитело содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7-9; (b) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10-13; (c) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-16; (d) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; (e) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и (f) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0079] Вариант осуществления 74. Способ по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности: (a) SEQ ID NO: 7, 10, 14, 17, 18 и 19, соответственно; или (b) SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 18 и 19, соответственно; или (c) SEQ ID NO: 9, 12, 15, 17, 18 и 19, соответственно; или (d) SEQ ID NO: 8, 13, 16, 17, 18 и 19, соответственно; или (e) SEQ ID NO: 8, 12, 16, 17, 18 и 19, соответственно.

[0080] Вариант осуществления 75. Способ по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

[0081] Вариант осуществления 76. Способ по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что второе антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20-24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

[0082] Вариант осуществления 77. Способ по любому из вариантов осуществления 1-71, отличающийся тем, что второе антитело связывает CD40.

[0083] Вариант осуществления 78. Способ по варианту осуществления 77, отличающийся тем, что второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности: (a) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 и 35 соответственно; или (b) SEQ ID NO: 30, 36, 32, 33, 34 и 35 соответственно.

[0084] Вариант осуществления 79. Способ по варианту осуществления 77, отличающийся тем, что второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0085] Вариант осуществления 80. Способ по варианту осуществления 77, отличающийся тем, что второе антитело содержит тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

[0086] Вариант осуществления 81. Способ по любому из вариантов осуществления 1-71, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело связывает CD70.

[0087] Вариант осуществления 82. Способ по варианту осуществления 81, отличающийся тем, что второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 53-58 соответственно.

[0088] Вариант осуществления 83. Способ по варианту осуществления 81, отличающийся тем, что второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[0089] Вариант осуществления 84. Способ по любому из вариантов осуществления 1-71, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело связывает ВСМА.

[0090] Вариант осуществления 85. Способ по варианту осуществления 84, отличающийся тем, что второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности: 47-52, соответственно.

[0091] Вариант осуществления 86. Способ по варианту осуществления 84, отличающийся тем, что второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

[0092] Вариант осуществления 87. Способ по любому из вариантов осуществления 1-86, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело представляет собой антитело IgG1 или IgG3.

[0093] Вариант осуществления 88. Способ по любому из вариантов осуществления 1-87, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело содержится в композиции антител, где по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител в композиции являются нефукозилированными.

[0094] Вариант осуществления 89. Способ по варианту осуществления 88, отличающийся тем, что каждое антитело в композиции содержит те же аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, что и второе антитело.

[0095] Вариант осуществления 90. Способ по любому из вариантов осуществления 1-89, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет усиленное связывание с одним или более активирующими FcγR по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа, при этом активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI.

[0096] Вариант осуществления 91. Способ по варианту осуществления 90, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет усиленное связывание с FcγRIIIa.

[0097] Вариант осуществления 92. Способ по любому из вариантов осуществления 1-91, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа.

[0098] Вариант осуществления 93. Способ по варианту осуществления 92, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIb.

[0099] Вариант осуществления 94. Способ по любому из вариантов осуществления 1-93, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что Fc второго антитела имеет усиленное связывание с FcγRIIIa и пониженное связывание с FcγRIIb.

[00100] Вариант осуществления 95. Способ по любому из вариантов осуществления 1-94, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело представляет собой моноклональное антитело.

[00101] Вариант осуществления 96. Способ по любому из вариантов осуществления 1-95, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело представляет собой гуманизованное антитело или человеческое антитело.

[00102] Вариант осуществления 97. Способ по любому из вариантов осуществления 1-96, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, рак шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, светлоклеточный рак почки, рак головы и шеи, рак легких, аденокарциному легких, рак желудка, рак из зародышевых клеток, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, меланому, новообразование центральной нервной системы, мезотелиому, лимфому, лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, миелому или саркому.

[00103] Вариант осуществления 98. Способ по любому из вариантов осуществления 1-97, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что рак представляет собой лимфому, лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому Ходжкина.

[00104] Вариант осуществления 99. Способ по любому из вариантов осуществления 1-98, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство и второе антитело вводят одновременно.

[00105] Вариант осуществления 100. Способ по варианту осуществления 99, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство и второе антитело вводят в составе одной фармацевтической композиции.

[00106] Вариант осуществления 101. Способ по любому из вариантов осуществления 1-98, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство и второе антитело вводят последовательно.

[00107] Вариант осуществления 102. Способ по варианту осуществления 101, отличающийся тем, что по меньшей мере первую дозу конъюгата антитело-лекарственное

средство вводят до первой дозы второго антитела; или при этом по меньшей мере первую дозу второго антитела вводят до первой дозы конъюгата антитело-лекарственное средство.

[00108] Вариант осуществления 103. Способ по любому из вариантов осуществления 1-102, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело истощает Т-регуляторные клетки (Treg).

[00109] Вариант осуществления 104. Способ по любому из вариантов осуществления 1-103, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство индуцирует иммунную память против клеток, экспрессирующих антиген, связанный конъюгатом антитело-лекарственное средство.

[00110] Вариант осуществления 105. Способ по варианту осуществления 104, отличающийся тем, что индукция иммунной памяти включает индукцию Т-клеток памяти.

[00111] Вариант осуществления 106. Способ по любому из вариантов осуществления 1-105, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело активирует антигенпрезентирующие клетки (APC).

[00112] Вариант осуществления 107. Способ по любому из вариантов осуществления 1-106, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело усиливает ответы Т-клеток CD8.

[00113] Вариант осуществления 108. Способ по любому из вариантов осуществления 1-107, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что второе антитело активирует костимулирующие рецепторы.

[00114] Вариант осуществления 109. Способ по любому из вариантов осуществления 1-108, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что введение ADC и второго антитела способствует высвобождению иммуноактивирующего цитокина.

[00115] Вариант осуществления 110. Способ по варианту осуществления 109, отличающийся тем, что иммуноактивирующий цитокин представляет собой CXCL10 или IFN γ .

[00116] Вариант осуществления 111. Способ по любому из вариантов осуществления 1-110, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что ADC и второе антитело действуют синергически.

[00117] Вариант осуществления 112. Способ по любому из вариантов осуществления 1-111, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что введение ADC и второго антитела в комбинации имеет профиль токсичности, сравнимый с ADC или вторым антителом, когда любое из них вводится в виде монотерапии.

[00118] Вариант осуществления 113. Способ по любому из вариантов осуществления 1-112, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что эффективная доза ADC и/или второго антитела при комбинированном введении меньше, чем при введении в виде монотерапии.

[00119] Вариант осуществления 114. Способ по любому из вариантов осуществления 1-113, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что рак характеризуется высокой нагрузкой опухолевых мутаций.

[00120] Вариант осуществления 115. Способ по любому из вариантов осуществления 1-114, 33-1 и 38-1, отличающийся тем, что рак имеет микросателлитную нестабильность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00121] **На ФИГ. 1** показано, что ненаправленные химиотерапевтические агенты нарушают ответы Т-клеток.

[00122] **На ФИГ. 2** показано лечение брентуксимабом ведотином (BV) Т-клеток CD30+ CD8. ADC ведотина, имеющие направленную доставку к Т-клеткам, не ингибируют пролиферацию.

[00123] **ФИГ. 3А-Е** показывают, что индукция стресса эндоплазматического ретикулама (ЭПР) лучше для конъюгатов ауристин-антитело-лекарственное средство (ADC), таких как ADC на основе ведотина, по сравнению с ADC с различной полезной нагрузкой. **На ФИГ. 3А** показана таблица различных клинически одобренных полезных нагрузок ADC. **На ФИГ. 3В** показан график реакции сигнализации стресса ЭПР. **На ФИГ. 3С** показан вестерн-блот-анализ клеток MIA-PaCa-2, обработанных ADC с различной полезной нагрузкой или паклитакселом при концентрациях IC50 в течение 36 или 48 часов. **На ФИГ. 3D-E** показаны клетки MIA-PaCa-2, экспрессирующие СНОР-управляемый репортер люциферазы (Signosis, Inc.), которые были обработаны ADC с различной полезной нагрузкой в диапазоне доз (**ФИГ. 3D**) или при дозе IC50 (цитотоксичность) (**ФИГ. 3E**). Индукция СНОР выражается кратностью индукции по сравнению с необработанными клетками.

[00124] **На ФИГ. 4А-В** показан потенциал иммуногенной гибели клеток (ICD) клинических полезных нагрузок ADC. Супернатанты собирали из опухолевых клеток поджелудочной железы MIA-PaCa-2, которые обрабатывали 1 мкг/мл ADC с различными полезными нагрузками в течение 72 часов. **На ФИГ. 4А** показано высвобождение TP, как определено с помощью Cell Titer Glo. **На ФИГ. 4В** показана секреция HMGB1, определенная при помощи ELISA.

[00125] **На ФИГ. 5А-С** показана оценка иммунной активации полезной нагрузки ADC. Активацию МНС-класса II (HLA-DR) на миелоидных клетках в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) оценивали с помощью проточной цитометрии после 48-часовой совместной инкубации PBMC с клетками L540су, которым вводили ADC с различной полезной нагрузкой (24 часа при концентрации IC50). 24-часовые супернатанты оценивали с помощью мультиплексного анализа Luminex на уровни цитокинов. **На ФИГ. 5А** показана иммунная активация с помощью ADC. **На ФИГ. 5В** показана экспрессия МНСII на моноцитах в ответ на воздействие ADC. **На ФИГ. 5С** показана экспрессия врожденного цитокина CXCL-10/IP10 в ответ на воздействие ADC в качестве меры активности иммунных клеток.

[00126] **На ФИГ. 6А-Е** показана оценка полезной нагрузки на основе трастузумаба. **На ФИГ. 6А** представлена таблица ADC трастузумаба, которые были оценены. **На ФИГ. 6В** показан график реакции сигнализации стресса ЭПР. **На ФИГ. 6С** показан вестерн-блоттинг

клеток BT474, обработанных ADC или лекарственным средством в течение 72 часов. На ФИГ. 6D-E показано, что ADC ведотина демонстрирует сильную активацию нескольких отличительных черт ICD. ADC трастузумаба в дозе 1 мкг/мл или свободный ММАЕ (100 нМ) демонстрируют различные ответы ICD в клетках рака молочной железы, экспрессирующих SKBR3 HER2. После 48 или 72 часов обработки среду собирали и использовали для измерения высвобождения АТФ (ФИГ. 6D) и уровней HMGB1 (ФИГ. 6E).

[00127] **На ФИГ. 7A** дополнительно проиллюстрирован путь иммуногенной гибели клеток (ICD).

[00128] **На ФИГ. 7B** представлена информация о полезных нагрузках некоторых ADC, используемых на ФИГ. 7B-E.

[00129] **На ФИГ. 7C-F** показана активация передачи сигналов JNK, генерируемая в ответ на обработку ММАЕ-ADC, по сравнению с майтанзин-ADC (ФИГ. 7C), камптотецин-ADC (ФИГ. 7D), антрациклин-ADC (ФИГ. 7E) и калихеамицин-ADC (ФИГ. 7F).

[00130] **На ФИГ. 8A-D** показана индукция СНОР, возникающая в ответ на лечение ММАЕ-ADC, по сравнению с ADC майтанзина (ФИГ. 8A), ADC камптотецина (ФИГ. 8B), ADC антрациклина (ФИГ. 8C) и других типов ADC, включая озогамидин-ADC, тезерин-ADC и АТ-ADC (ФИГ. 8D).

[00131] **На ФИГ. 9A-D** показано высвобождение АТФ и HMGB1, генерируемых в ответ на лечение ММАЕ-ADC, по сравнению с майтанзин-ADC (ФИГ. 9A), камптотецин-ADC (ФИГ. 9B), антрациклин-ADC (ФИГ. 9C), и другими типам ADC, включая озогамидин-ADC, тезерин-ADC и АТ-ADC (ФИГ. 9D).

[00132] **На ФИГ. 10A-D** показаны экспрессия МНСII и высвобождение CXCL-10/IP10, генерируемых в ответ на лечение ММАЕ-ADC, по сравнению с майтанзин-ADC (ФИГ. 10A), камптотецин-ADC (ФИГ. 10B), антрациклин-ADC (ФИГ. 10C) и других типов ADC, включая озогамидин-ADC и тезерин-ADC (ФИГ. 10D).

[00133] **На ФИГ. 10E** приведены результаты с ФИГ. 7B-E, ФИГ. 8A-D, ФИГ. 9A-D и ФИГ. 10A-D.

[00134] **На ФИГ. 11A-D** показано связывание антител с FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa в яичниках китайского хомячка (клетки СНО). На ФИГ. 11A показаны оцененные антитела. На ФИГ. 11B показано связывание с FcγRIIa. На ФИГ. 11C показано связывание с FcγRIIIa. На ФИГ. 11D показано связывание с FcγRIIb.

[00135] **На ФИГ. 12A-D** показаны уровни CXCL10 (ФИГ. 12A), IFNγ (ФИГ. 12B), IL10 (ФИГ. 12C) и макрофагального цитокина (MDC; CCL22) (ФИГ. 12D) в клетках рака поджелудочной железы MIA-PaCa 2, обработанных агонистами CD40 и химиотерапевтическими агентами.

[00136] **На ФИГ. 13A-D** показаны уровни CXCL10 (ФИГ. 13A-B) и IL10 (ФИГ. 13C-D) в клеточных линиях меланомы, обработанных агонистами CD40 и химиотерапией.

[00137] **На ФИГ. 14A-C** показаны уровни CXCL14 (ФИГ. 14A), IL14 (ФИГ. 14B) и IFNγ (ФИГ. 14C) в опухолевых клетках меланомы, легкого, молочной железы и поджелудочной железы.

[00138] **На ФИГ. 15** показаны данные *in vivo* для SEA-CD40 ведотина в комбинации с комбинацией химиотерапии ADC, оцененные на трансгенной модели человеческого CD40, где антигеном-мишенью опухоли был Thy1.1.

[00139] **На ФИГ. 16** показаны уровни CXCL10 в опухолевых клеточных линиях, которые обрабатывали ADC-ММАЕ, направленным на опухолеассоциированный антиген, в сочетании с целевыми антителами TIGIT с различными эффекторными функциональными каркасами.

[00140] **На ФИГ. 17** показаны уровни $IFN\gamma$ в опухолевых клеточных линиях, которые обрабатывали ADC-ММАЕ, направленным на опухолеассоциированный антиген, в сочетании с целевыми антителами TIGIT с различными эффекторными функциональными каркасами.

[00141] **На ФИГ. 18А-С** показаны данные *in vitro* и *in vivo*, демонстрирующие повышенную активность нефукозилированного антитела TIGIT и ADC *vc*-ММАЕ («ADC ведотина»). На ФИГ. 18А показано, что нефукозилированное антитело TIGIT, имеющее усиленный (нефукозилированный) каркас Fc IgG1 (SEA-TGT), значительно лучше стимулировало иммунную активацию за счет индукции цитокина IP10 по сравнению с соответствующим антителом TIGIT с нулевым эффекторным каркасом (LALA) или стандартным каркасом Fc IgG1 дикого типа, когда эти антитела совместно культивировали с опухолевыми клетками, убитыми нацеливающим ADC *vc*-ММАЕ. Комбинация с SEA-TGT показала синергетическую активацию иммунных клеток. На ФИГ. 18В и ФИГ. 18С показан противоопухолевый ответ, когда мышам, с имплантированными либо сингенными опухолевыми клетками СТ26 (ФИГ. 18В), либо сингенными опухолевыми клетками Rensa (ФИГ. 18С), вводили: 1) субоптимальную дозу ADC (Thy1.1 *vc*-ММАЕ ADC на ФИГ.18В и EphA2 ADC *vc*-ММАЕ на ФИГ.18С); 2) серию субоптимальных доз mIgG2a SEA-TGT (антитело SEA-TGT, преобразованное в нефукозилированный мышинный IgG2a, который соответствует нефукозилированному человеческому каркасу IgG1); или 3) комбинацию обоих агентов. Как видно из этих фигур, совместное введение этих двух агентов значительно повышало эффективность лечения, в том числе вызывало высокий процент лечебных ответов на этих различных моделях опухолей.

[00142] **На ФИГ. 19** показаны данные *in vivo*, демонстрирующие повышенную активность нефукозилированного антитела TIGIT (SEA-TGT) и ADC ведотина SGN-B7H4 (B7H4V). На ФИГ. 19 показан противоопухолевый ответ, когда мышам, которым имплантировали сингенные опухолевые клетки Rensa, вводили субтерапевтическую дозу SEA-TGT и субтерапевтическую дозу B7H4V или субтерапевтическую дозу SEA-TGT и терапевтическую дозу оксалиплатина. Как показано на ФИГ. 19, совместное введение SEA-TGT и B7H4V значительно повышало эффективность лечения даже при субтерапевтических дозах каждого из них, в том числе вызывая высокий процент лечебных ответов.

[00143] **На ФИГ. 20А-В** продемонстрированы комбинаторные эффекты SEA-CD70, нефукозилированного антитела к CD70, и SGN-35, ADC к CD30, содержащего ММАЕ. **На**

ФИГ. 20А показана *in vivo* оценка роста опухоли модели ксенотрансплантата неходжкинской лимфомы (НХЛ). **На ФИГ. 20В** показана оценка выживаемости Каплана-Мейера модели ксенотрансплантата НХЛ при конечной точке размера опухоли 500 мм³. Тх (лечение) и стрелка указывают день начала лечения (19 дней после имплантации).

[00144] **На ФИГ. 21А-В** демонстрируют синергетические эффекты SEA-BCMA, нефукозилированного антитела к BCMA, и SGN-CD48A, ADC к CD48, содержащего MMAE. **На ФИГ. 21А** показана *in vivo* оценка выживаемости модели ксенотрансплантата, а **на ФИГ. 21В** показана оценка модели ксенотрансплантата с использованием люциферазы *in vivo*.

[00145] **На ФИГ. 22А-С** показано, что ADC ведотина индуцирует рекрутирование и активацию иммунных клеток *in vivo*. **ФИГ. 22А:** ксенотрансплантаты опухоли, выделенные от животных, получавших лечение ADC vs-MMAE или несвязывающим изотипом ADC vs-MMAE в течение 8 дней и подвергнутых проточной цитометрии или профилированию цитокинов. **ФИГ. 22В:** CD45-положительные иммунные клетки окрашивали на CD11c, и активацию наблюдали путем окрашивания экспрессии МНС-класса II на клеточной поверхности. **ФИГ. 22С** Внутриопухолевые цитокины измеряли с помощью Luminex.

[00146] **На ФИГ. 23А-В** показана индукция Т-клеточной памяти с помощью ADC vs-MMAE. В сингенной модели Ренса мышей излечили обработкой ADC vs-MMAE (**ФИГ. 23А**). Мышам, излеченным с помощью лечения, повторно вводили опухолевые клетки Ренса, и эти мыши отторгали впоследствии имплантированные опухолевые клетки (**ФИГ. 23В**).

[00147] **На ФИГ. 24** показан защитный противоопухолевый иммунитет, обеспечиваемый клетками, обработанными MMAE или ADC vs-MMAE. Раковые клетки A20 обрабатывали брентуксимабом ведотином (BV) или MMAE, а умирающие и мертвые клетки вводили мышам. **На ФИГ. 24** показано, что иммунизированные мыши демонстрировали более сильный иммунный ответ, отторгая впоследствии имплантированные клетки A20.

[00148] **На ФИГ. 25** показана типичная модель кластеризации рецепторов и агонизма нефукозилированным антителом к CD40, SEA-CD40; и типичная модель образования агониста рецептора и синапса нефукозилированным антителом к TIGIT, SEA-TGT. Как показано, антитело SEA-CD40 может связывать CD-40, экспрессированный на антигенпрезентирующих клетках (APC), с Fc-фрагментом антитела, связывающимся с FcγRIIIa, экспрессируемым на естественных киллерах (NK) или на моноцитах, что способствует кластеризации рецепторов. Антитело SEA-TGT, напротив, связывается с TIGIT, экспрессируемым на Т-клетках, а область Fc антитела связывается с FcγRIIIa, экспрессируемым на APC.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ВВЕДЕНИЕ

[00149] Гибель клеток в результате апоптоза представляет собой тихий толерогенный процесс. Однако определенные цитотоксические агенты, в том числе

специфические противоопухолевые агенты, такие как антрациклины, оксалиплатин или облучение, вызывают характерную форму гибели клеток, называемую иммуногенной гибелью клеток (ICD). ICD представляет собой режим регулируемой гибели клеток, который вызывает иммунный ответ РВМС и Т-клеток против апоптотических раковых клеток. Как показано в данном документе, обработка некоторыми агентами, разрушающими тубулин, такими как ауристатин (например, MMAE и MMAF), приводит к тому, что белки, обычно присутствующие в ЭПР, становятся доступными на клеточной поверхности. Повышенное фагоцитозное поглощение и презентация опухолевых антигенов Т-клеткам впоследствии активируют адаптивную иммунную систему. Как дополнительно показано в данном документе, ауристатин, такие как MMAE и MMAF, явно способны стимулировать индукцию ICD, тем самым позволяя иммунной системе распознавать и повышать цитотоксическую активность против опухолей. По сути, клетки, погибающие от ICD, служат вакциной для стимуляции опухолеспецифических иммунных ответов против любого остаточного заболевания или в случае рецидива/возобновления.

[00150] Как показали экспериментальные результаты, описанные в данном документе, опухолевые клетки, подвергшиеся ICD в ответ на ауристатин, такие как MMAE и MMAF, демонстрируют уникальный набор характеристик, которые усиливают их иммуногенность и апоптоз, включая: транслокацию кальретикулина на клеточную поверхность, секрецию АТФ во время апоптоза и высвобождение ядерного белка HMGB1. ICD индуцирует высвобождение специфических DAMPS и молекулярных паттернов, связанных с опасностью (DAMPs), которые обладают уникальной способностью создавать провоспалительную среду, которая способствует распознаванию Т-клетками опухолевых антигенов. Как показано в данном документе, в то время как другие химиотерапевтические агенты могут индуцировать апоптоз, не все они могут индуцировать столь сильный ответ ICD, как ауристатин, такие как MMAE и MMAF.

[00151] Ключевые этапы ICD генерируют серию сигналов, которые активируют врожденную иммунную систему, чтобы распознавать опухолевые клетки и уничтожать их. Во-первых, лекарственное средство вызывает ЭПР-стресс, и это, в свою очередь, приводит к поверхностному воздействию DAMP, включая кальретикулин, белки теплового шока (HSP70 и HSP90), секрецию АТФ и высвобождение белка группы высокой подвижности В1 (HMGB1). Воздействие этих DAMP и секреция иммуномодулирующих агентов во время процесса ICD могут действовать совместно, чтобы инициировать иммунные ответы, включая активацию дендритных клеток и других антиген-презентирующих клеток, что приводит к фагоцитозу и разрушению клеток, подвергшихся стрессу ЭПР.

[00152] Как отмечалось выше, инициация ICD связана со стрессом ЭПР. Перегрузка способности ЭПР в отношении развернутых полипептидов или нарушение среды укладки белков инициирует стрессовые реакции ЭПР. ЭПР тесно связан с сетью микротрубочек, которая обеспечивает структуру и эластичность за счет динамической сборки и сокращения. Разрушение сети микротрубочек воздействует на сеть ЭПР и приводит к тяжелому стрессу ЭПР, который запускает экспрессию характеристик, необходимых для

индукции ICD, и приводит к ответу на стресс, называемому ответом несвернутого белка (UPR). Ответ UPR имеет несколько ответвлений, которые включают увеличение pIRE1, нижестоящее фосфорилирование JNK и расщепление ATF4.

[00153] Данное изобретение частично основано на обнаружении того, что некоторые агенты, разрушающие тубулин, такие как ауристатин (например, MMAE и MMAF), способны генерировать уникальный ответ ICD по сравнению с другими цитотоксическими агентами и, в частности, по сравнению с другими полезными нагрузками, которые используются на конъюгатах антитело-лекарственное средство. Изобретение также основано на открытии того, что сочетание уникальной способности таких агентов управлять ICD с агентами, усиливающими иммунный ответ, может усиливать противоопухолевую активность. В частности, было обнаружено, что такой иммунный агонизм был достигнут с использованием антител, обладающих способностью связывать определенные мишени, участвующие в передаче иммунных сигналов, и обладающих улучшенными характеристиками связывания Fc и эффекторной функцией. Желаемые характеристики связывания Fc включают такие активности, как усиленное связывание с активирующими FcγR, пониженное связывание с ингибирующими FcγR, усиленную активность ADCC и/или усиленную активность ADCP. Некоторые такие антитела с желаемой активностью были нефукозилированными.

[00154] Основываясь на этих коллективных выводах, авторы данного изобретения продемонстрировали, как более подробно описано в данном документе, что индукция ICD с использованием определенных разрушителей тубулина, таких как MMAE и MMAF, в сочетании с антителами, направленными на активаторы иммунных клеток, которые также обладают повышенной активностью Fc, приводит к синергически улучшенным антиопухолевым ответам. Также было показано, что использование ADC, а не стандартных химиотерапевтических агентов, смягчает ухудшение Т-клеточного ответа, наблюдаемое при традиционной химиотерапии, что обеспечивает дополнительное преимущество этого конкретного комбинированного подхода.

[00155] Соответственно, некоторые варианты осуществления, представленные в данном документе, представляют собой комбинированную терапию, которая включает введение субъекту с раком: (1) конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего разрушитель тубулина, конъюгированный с первым антителом, которое связывает опухлеассоциированный антиген; и (2) антитела, которое связывается с активатором иммунных клеток, причем второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR. В некоторых вариантах осуществления второе антитело является нефукозилированным. В некоторых вариантах осуществления второе антитело обладает повышенной активностью ADCC и/или ADCP.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00156] Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области. См., например, Lackie, *DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*,

Elsevier (4th ed. 2007); Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Любые способы, устройства и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы при практическом применении данного изобретения.

[00157] Используемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «антитело» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

[00158] Термин «около», используемый в данном описании, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известного специалисту в данной области техники.

[00159] Термин «антитело» включает интактные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, где антигенсвязывающие фрагменты содержат антигенсвязывающую область и по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи, включающую аспарагин (N) 297, расположенный в CH2. Как правило, «вариабельная область» содержит антигенсвязывающую область антитела и участвует в специфичности и аффинности связывания. См., *Fundamental Immunology 7th Edition*, Paul, ed., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins(2013). Легкие цепи обычно классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи обычно классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

[00160] Термин «антитело» также включает двухвалентные или биспецифичные молекулы, диатела, триатела и тетраатела. Двухвалентные и биспецифические молекулы описаны, например, в Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1547, Pack and Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31:1579, Hollinger *et al.* (1993), *PNAS. USA* 90:6444, Gruber *et al.* (1994) *J Immunol.* 152:5368, Zhu *et al.* (1997) *Protein Sci.* 6:781, Hu *et al.* (1996) *Cancer Res.* 56:3055, Adams *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:4026 и McCartney, *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8:301.

[00161] Термин «антитело» включает само антитело (голое антитело) или антитело, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством.

[00162] «Моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Определение «моноклональное» указывает на характер антитела, полученного из, по существу, однородной популяции антител, и не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с данным изобретением могут быть получены с помощью гибридомных способов, впервые описанных в источнике Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495, или могут быть получены с помощью способов рекомбинации ДНК (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых

библиотек антител с помощью способов, описанных, например, в Clackson et al. (1991) *Nature*, 352:624-628 and Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, например, или могут быть получены другими способами. Описанные в данном документе антитела представляют собой моноклональные антитела.

[00163] Специфическое связывание моноклонального антитела с антигеном-мишенью означает аффинность не менее 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} . Специфическое связывание заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего по меньшей мере с одной неродственной мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между определенными функциональными группами или определенного пространственного соответствия (например, тип замка и ключа), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом Ван-дер-Ваальсовых сил.

[00164] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Эта переменная область изначально экспрессируется связанной с расщепляемым сигнальным пептидом. Переменную область без сигнального пептида иногда называют зрелой переменной областью. Так, например, зрелая переменная область легкой цепи означает переменную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию.

[00165] Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменная и константная области соединены областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D», состоящая еще примерно из 10 или более аминокислот. (См., *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7, полностью включена в данный документ посредством ссылки для всех целей).

[00166] Зрелые переменные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания одинаковы. Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к C-концу как легкие, так и тяжелые цепи включают домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот для каждого

домена соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1987 and 1991) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989), или смесь Kabat и Chothia, или IMGT (информационная система ImMunoGeneTics), AbM или Contact, или другим общепринятым определениям CDR. Kabat также предлагает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация Kabat), в котором соответствующим остаткам между разными тяжелыми цепями или между разными легкими цепями присваиваются одинаковые номера. Если из контекста не следует иное, для обозначения положения аминокислот в переменных областях используется нумерация по Kabat. Если иное не очевидно из контекста, нумерация EU используется для обозначенных позиций в константных областях.

[00167] «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, которое сохраняет реактивность нечеловеческого антитела, но в то же время менее иммуногенно у человека. Это может быть достигнуто, например, путем сохранения нечеловеческих областей CDR и замены остальных частей антител их человеческими копиями. См., например, Morrison *et al.*, *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

[00168] Используемый в данном документе термин «химерное антитело» относится к молекуле антитела, в которой (а) константная область или ее часть заменены таким образом, что сайт связывания антигена (переменная область, CDR или ее часть) связан с константной областью другого вида.

[00169] Термин «эпитоп» относится к участку на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, соединенных третичной укладкой одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичным сгибанием, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Обычно эпитоп включает по меньшей мере 3, а более обычно - по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерно-магнитный резонанс. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

[00170] Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы с помощью простого иммунологического анализа, показывающего способность одного антитела конкурировать за связывание антигенами с другим антителом. Эпитоп антитела также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для выявления контактных остатков. В альтернативном варианте два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют

связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[00171] Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере в 2, 5, 10, 20 или 100 раз) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или 99%, что измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицируемые в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонному антителу, для появления стерического затруднения для антител.

[00172] Термин «специфически связывает» относится к молекуле (например, антителу или фрагменту антитела), которая связывается с мишенью с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью по отношению к этой мишени в образце, чем она связывается с нецелевым соединением. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с мишенью, представляет собой антитело, которое связывается с мишенью с по меньшей мере в 2 раза большей аффинностью, чем нецелевые соединения, такой как, например, с по меньшей мере в 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз большей аффинностью. Например, антитело, которое специфически связывается с TIGIT, обычно связывается с TIGIT с по меньшей мере в 2 раза большей аффинностью, чем с мишенью, которая не является TIGIT. Специалисту в данной области техники будет понятно, что после прочтения данного определения, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Таким образом, «специфическое связывание» не обязательно требует исключительного связывания (несмотря на то, что может его включать).

[00173] Термин «аффинность связывания» используется в данном документе в качестве определения меры прочности нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, антитела или его фрагмента, и антигеном. Термин «аффинность связывания» используется для описания одновалентных взаимодействий (внутренней активности).

[00174] Аффинность связывания между двумя молекулами, например, антителом или его фрагментом, и антигеном посредством моновалентного взаимодействия может быть количественно определена путем определения константы диссоциации (K_D). В свою очередь, K_D может быть определена путем измерения кинетики образования и диссоциации

комплекса с использованием, в качестве неограничивающего примера, метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore™). Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называют константами скорости ассоциации k_a (или k_{on}) и константой скорости диссоциации k_d (или k_{off}) соответственно. K_D относится к k_a и k_d через уравнение $K_D = k_d/k_a$. Значение константы диссоциации может быть определено непосредственно с помощью известных способов и может быть вычислено даже для сложных смесей такими способами, как, например, изложено в Casesi *et al.* (1984, *Byte* 9: 340-362). Например, K_D может быть установлена с использованием анализа связывания нитроцеллюлозного фильтра с двумя фильтрами, например, как описано в Wong & Lohman (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5428-5432). Другие стандартные анализы для оценки связывающей способности лигандов, таких как антитела, с антигенами-мишеням известны в данной области техники, включая, например, иммуноферментный анализ (ИФА), вестерн-блоты, радиоиммунный анализ (РИА) и анализ с помощью проточной цитометрии, а также другие анализы, приведенные в качестве примеров в другой части данного документа. Кинетика связывания и аффинность связывания антитела также могут быть оценены с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники или описанных в разделе «Примеры» ниже, таких как поверхностный плазмонный резонанс (SPR), например, с использованием системы Biacore™; анализы кинетического исключения, такие как KinExA®; и биослойная интерферометрия (например, с использованием платформы ForteBio® Octet). В некоторых вариантах осуществления аффинность определяют с использованием биослойной интерферометрии. См., например, Wilson *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38:400-407 (2010); Dysinger *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 379:30-41 (2012) и Estep *et al.*, *Mabs*, 2013, 5:270-278.

[00175] Термин «вступать в перекрестную реакцию», в контексте данного документа, относится к способности антитела связываться с антигеном отличным от антигена, против которого было выработано антитело. В некоторых вариантах осуществления перекрестная специфичность относится к способности антитела связываться с антигеном другого вида, чем антиген, против которого было выработано антитело. В качестве неограничивающего примера, антитело к TIGIT, как описано в данном документе, которое вырабатывается против TIGIT антигена человека, может проявлять перекрестную специфичность с TIGIT другого вида (например, мыши или обезьяны).

[00176] «Выделенное» антитело относится к антителу, которое было идентифицировано, выделено и/или восстановлено из компонентов его естественной среды, и/или антителу, полученному рекомбинантным путем. «Очищенное антитело» представляет собой антитело, которое, как правило, не менее чем на 50% по массе очищено от интерферирующих белков и других примесей, возникающих в результате его производства или очистки, но не исключает возможности того, что моноклональное антитело сочетается с избытком фармацевтически приемлемого носителя (носителей) или другой несущей среды, предназначенной для облегчения его использования. Мешающие

белки и другие примеси могут включать, например, компоненты клеток, из которых антитело выделено или рекомбинантно получено. Иногда моноклональные антитела по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95 или 99% по массе очищены от мешающих белков и загрязняющих веществ, полученных в результате производства или очистки. Описанные в данном документе антитела, включая крысиные, химерные, венированные и гуманизированные антитела, могут быть предоставлены в выделенной и/или очищенной форме.

[00177] Термин «LAE» относится к трипептидному линкеру лейцин-аланин-глутаминовая кислота. Термин «dLAE» относится к трипептидному линкеру D-лейцин-аланин-глутаминовая кислота, в котором лейцин в трипептидном линкере находится в D-конфигурации.

[00178] Термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и тому подобное используются взаимозаменяемо и относятся, за исключением случаев, где указано, к млекопитающим, таким как люди и приматы, не являющиеся людьми, а также к кроликам, крысам, мышам, козам, свиньям и другим видам млекопитающих. Термин не обязательно указывает, что у субъекта было диагностировано определенное заболевание, но обычно относится к индивидууму под наблюдением врача.

[00179] Термины «терапия», «лечение» и «улучшение» относятся к любому снижению тяжести симптомов. В случае лечения рака лечение может относиться к уменьшению, например, размера опухоли, количества раковых клеток, скорости роста, метастатической активности, гибели нераковых клеток и т.д. Термины «лечить» и «предотвращать», в контексте данного документа, не предназначены для обозначения абсолютных терминов. Лечение и профилактика могут включать любую задержку начала, улучшение симптомов, улучшение выживаемости пациентов, увеличение времени или частоты выживания и т.д. Лечение и профилактика могут быть полными (не обнаруживаемые симптомы остаются) или частичными, так что симптомы встречаются реже или они являются менее тяжелыми, чем у пациента, не получающего лечения, описанного в данном документе. Эффект лечения можно сравнивать с индивидом или группой индивидов, не проходящих лечение, или с тем же пациентом до лечения или в другое время во время лечения. В некоторых аспектах тяжесть заболевания снижается по меньшей мере на 10% по сравнению, например, с индивидуумом перед введением или контрольным индивидуумом, не проходящим лечение. В некоторых аспектах тяжесть заболевания снижается по меньшей мере на 25%, 50%, 75%, 80% или 90%, или в некоторых случаях более не выявляется с использованием стандартных диагностических методов.

[00180] Термин «терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» агента (например, антитела, как описано в данном документе), в контексте данного документа, представляет собой количество агента, который предотвращает, ослабляет, облегчает, улучшает или уменьшает тяжесть симптомов заболевания (например, рака) у субъекта.

[00181] Термины «вводить», «введенный» или «введение» относятся к способам

доставки агентов, соединений или композиций до нужного места биологического действия. Данные способы включают, но не ограничиваются ими, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутрикожную доставку, внутримышечную доставку, доставку в толстую кишку, ректальную доставку или интраперитонеальную доставку. Способы введения, которые необязательно используются с агентами и способами, описанными в данном документе, включают, например, обсуждаемые в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current ed.; Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (current edition), Mack Publishing Co., Easton, PA.

III. ТИПИЧНЫЕ АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ АКТИВАТОР ИММУННЫХ КЛЕТОК

[00182] Как отмечалось выше, авторы данного изобретения обнаружили, что индуцирование ICD путем введения конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего определенные разрушители тубулина (например, ауристатин, включая, например, MMAE и MMAF) в сочетании с запуском иммунного ответа с использованием антитела, которое непосредственно связывается с белком или косвенно участвующие в иммунной регуляции и обладающие повышенной активностью Fc, могут приводить к улучшенным противоопухолевым ответам, включая синергические ответы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают введение субъекту с раком антитела, которое связывается с мишенью, участвующей в регуляции иммунного ответа, при этом такое связывание индуцирует, стимулирует или усиливает иммунный ответ. Мишень такого антитела может быть обозначена как «активатор иммунных клеток». Используемый в данном документе термин «активатор иммунных клеток» относится к молекуле (например, трансмембранному белку), которая участвует в модулировании ответа иммунных клеток, либо положительно, либо отрицательно. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с рецептором на иммунных клетках или опухолях и приводит к прямому вовлечению иммунных клеток или высвобождению отрицательного ингибирующего сигнала. В некоторых вариантах осуществления активатор иммунных клеток представляет собой молекулу, участвующую в передаче сигнала T-клетками. В некоторых вариантах осуществления активатор иммунных клеток модулирует (например, активирует) антиген-презентирующие клетки (APC). Активатор иммунных клеток в некоторых вариантах осуществления представляет собой белок иммунной контрольной точки. Другие примеры потенциальных активаторов иммунных клеток перечислены ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с рецептором на иммунных клетках или опухолях. Любое из описанных в данном документе антител, которые связывают активатор иммунных клеток, можно комбинировать с любым из описанных в данном документе конъюгатов антитело-лекарственное средство.

[00183] Антитело, которое связывает мишень, участвующую в иммунной регуляции (например, активатор иммунных клеток), также содержит Fc, обладающую одним или несколькими или всеми из следующих признаков в любой комбинации: 1) усиленное

связывание с одним или более активирующими FcγR, 2) сниженное связывание с ингибирующими FcγR, 3) не является фукозилированным, 4) имеет повышенную активность ADCC, 5) имеет повышенную активность ADCP, 6) активирует антигенпрезентирующие клетки (APC), 7) усиливает ответы Т-клеток CD8, 8) активирует костимулирующие рецепторы, 9) активирует врожденный клеточный иммунный ответ и/или 10) вовлекает NK-клетки.

[00184] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc с усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR и/или сниженным связыванием с одним или более ингибирующими FcγR для получения желаемого усиленного профиля связывания FcγR. Активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI. Ингибиторные FcγR включают, например, FcγRIIIb.

[00185] В определенных вариантах осуществления антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa. В других вариантах осуществления антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRIIa. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRI. В определенных вариантах осуществления антитело содержит Fc с усиленным связыванием с FcγRIIIa, FcγRIIa и FcγRI.

[00186] В некоторых вариантах осуществления антитело в дополнение к усиленному связыванию с активирующим FcγR или отдельно от него имеет сниженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело имеет пониженное связывание с FcγRIIa и/или FcγRIIIb.

[00187] В некоторых вариантах осуществления антитело является нефукозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно имеет один из профилей связывания FcγR, описанных выше.

[00188] В определенных вариантах осуществления Fc антитела содержит аминокислотные замены по сравнению с Fc дикого типа для усиления связывания с активирующим FcγR и/или снижения связывания с одним или более ингибирующими FcγR для получения профиля связывания FcγR, такого как описано выше. Например, в некоторых вариантах осуществления Fc антитела содержит замены S293D, A330L и I332E в константной области тяжелой цепи.

[00189] Дополнительные подробности о способах получения антител с желаемым профилем FcγR, как и о способах получения нефукозилированных антител, представлены ниже.

А. Примеры активаторов иммунных клеток

[00190] Неограничивающие примерные мишени или активаторы иммунных клеток, на которые может быть нацелено антитело, включают: антитело к рецептору мюллерова гормона II (AMHR2), B7, B7H1, B7H2, B7H3, B7H4, BAFF-R, BCMA (антиген созревания В-клеток), Bst1/CD157, комплемент C5, хемокиновый рецептор CC 4 (CCR4), CD123, CD137, CD19, CD20, CD25 (IL2RA), CD276, CD278, CD3, CD32, CD33, CD37, CD38, CD4 и HIV-1 сайтов связывания gp120, CD40, CD70, CD70 (член семейства лигандов рецептора

ФНО), CD80, CD86, клаудин 18.2, с-MET, CSF1R, CTLA-4, EGFR, EGFR MET протоонкоген, EPHA3, ERBB2, ERBB3, FGFR2b, FLT3, G1TR, глюкокортикоид-индуцированный рецептор ФНО (G1TR), HER2, HER3, HLA, ICOS, IDO1, IFNAR1, IFNAR2, IGF-1R, IL-3Ральфа (CD123), IL-5R, IL-5Ральфа, LAG-3, протоонкоген MET, OX40 (CD134), PD-1, PD-L1, PD-L2, PVRIG, сильно гликозилированный муциноподобный домен гликопротеина (GP) EBOV респираторно-синцитиального вируса (RSV), резус (Rh) D, иммуноглобулин-подобные лектины 8, связывающие сиаловую кислоту (Siglec-8), сигнальную молекулу активации лимфоцитов (SLAMF7/CS1), антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами Т-клеточного рецептора (CTLA4), TIGIT, TIM3 (HAVCR2), опухолеспецифический гликоэпитоп Muc1 (TA-Muc1), VSIR (VISTA) и VTCN1.

[00191] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонист активатора иммунных клеток. В некоторых таких вариантах осуществления антитело представляет собой агонист активатора иммунных клеток, выбранный из CD80, CD86, OX40 (CD134), G1TR, CD137, CD40, VTCN1, CD276, IFNAR2, IFNAR1, CSF1R, VSIR (VISTA) и HLA.

[00192] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антагонист активатора иммунных клеток. В некоторых таких вариантах осуществления антитело представляет собой антагонист активатора иммунных клеток, выбранный из CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, B7, TIM3 (HAVCR2), PVRIG, TIGIT, CD25 (IL2RA) и IDO1.

[00193] В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток для способов, представленных в данном документе, может быть ингибитором белка контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое связывает активатор иммунных клеток для способов, представленных в данном документе, может представлять собой ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор PD-L2, ингибитор CTLA-4, ингибитор LAG-3, ингибитор B7, ингибитор TIM3 (HAVCR2), ингибитор OX40 (CD134), агониста G1TR, агониста CD137, агониста CD40, ингибитор VTCN1, ингибитор IDO1, ингибитор CD276, ингибитор PVRIG, ингибитор TIGIT, ингибитор CD25 (IL2RA), ингибитор IFNAR2, ингибитор IFNAR1, ингибитор CSF1R, ингибитор VSIR (VISTA) или терапевтический агент, нацеленный на HLA. Такие ингибиторы, активаторы или терапевтические агенты дополнительно представлены ниже. В любом из вариантов осуществления данного изобретения антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, может представлять собой антитело, содержащее Fc с усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, представляет собой нефукозилированное антитело.

[00194] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор CTLA-4. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело к CTLA-4. Примеры

антител к CTLA-4 включают, но не ограничиваются ими, антитела, описанные в патентах США №: 5,811,097; 5,811,097; 5,855,887; 6,051,227; 6,207,157; 6,682,736; 6,984,720 и 7,605,238, все из которых полностью включены в данный документ. В одном варианте осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой тремелимумаб (также известный как тицилимумаб или CP-675,206) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб (также известный как MDX-010 или MDX-101) или его нефукозилированную версию. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG, которое связывается с CTLA-4. Ипилимумаб продается под торговым названием Yervoy™.

[00195] В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1. Примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы, описанные в патентах США № 7,488,802; 7,943,743; 8,008,449; 8,168,757; 8,217,149, и публикациях заявок на патенты PCT № WO2003042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 и WO2011161699, все из которых включены в данный документ во всей их полноте.

[00196] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой BGB-A317, ниволумаб (также известный как ONO-4538, BMS-936558 или MDX1106) или пембролизумаб (также известный как MK-3475, SCH 900475 или ламбролизумаб), или их нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб или его нефукозилированную версию. Ниволумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG4 к PD-1 и продается под торговым названием Opdivo™. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб или его нефукозилированную версию. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4 и продается под торговым названием Keytruda™. В еще одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой ST-011, гуманизированное антитело или его нефукозилированную версию. ST-011, введенное отдельно, не показало ответа при лечении острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) при рецидиве. В еще одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой AMP-224, слитый белок или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой BGB-A317 или его нефукозилированную версию. BGB-A317 представляет собой моноклональное антитело, в котором специально сконструирована способность связывать Fc-гамма-рецептор I и которое обладает уникальной сигнатурой связывания с PD-1 с высокой аффинностью и превосходной специфичностью к мишени. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой цемиплимаб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой камрелизумаб или его

нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой синтилимаб или его нефукозилированную версию. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой тислелизумаб или его нефукозилированную версию. В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой TSR-042 или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой PDR001 или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой торипалимаб или его нефукозилированную версию.

[00197] В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор PD-L1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1. В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (также известный как MDX-1105-01) или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб (также известный как MPDL3280A и Tecentriq®) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой авелумаб или его нефукозилированную версию.

[00198] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой ингибитор PD-L2. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой антитело к PD-L2. В одном варианте осуществления антитело к PD-L2 представляет собой rHIgM12B7A или его нефукозилированную версию.

[00199] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой ингибитор гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3). В одном варианте осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой IMP321, растворимый слитый белок Ig (Brignone *et al.*, *J. Immunol.*, **2007**, *179*, 4202-4211) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой BMS-986016 или его нефукозилированную версию.

[00200] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой ингибитор В7. В одном варианте осуществления ингибитор В7 представляет собой ингибитор В7-Н3 или ингибитор В7-Н4. В одном варианте осуществления ингибитор В7-Н3 представляет собой MGA271, антитело к В7-Н3 (Loo *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2012**, *3834*) или его нефукозилированную версию. В некоторых вариантах осуществления ингибитор В7 представляет собой ингибитор В7-Н4. Неограничивающим иллюстративным ингибитором В7-Н4 является FPA150, нефукозилированное антитело к В7-Н4. См. PCT/US2018/047805.

[00201] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой ингибитор TIM3 (домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен 3 муцина) (Fourcade *et al.*, *J. Exp. Med.*, **2010**, *207*, 2175-86; Sakuishi *et al.*, *J. Exp. Med.*, **2010**, *207*, 2187-94).

[00202] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело-агонист OX40 (CD134). В определенных вариантах осуществления антитело к OX40 представляет собой MEDI6469 или его нефукозилированную версию.

[00203] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой агонист GITR. В одном варианте осуществления активатором иммунных клеток является антитело к GITR или его нефукозилированная версия. В одном варианте осуществления антитело к GITR представляет собой TRX518 или его нефукозилированную версию.

[00204] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой агонист CD137. В одном варианте осуществления активатор иммунных клеток представляет собой антитело к CD137. В одном варианте осуществления антитело к CD137 представляет собой урелумаб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к CD137 представляет собой PF-05082566 или его нефукозилированную версию.

[00205] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой агонист CD40. В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело к CD40. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой CF-870,893 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой MP0317 (Molecular Partners) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой YH003 (Eucure Biopharma) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой CDX-1140 (Celldex Therapeutics) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой YH003 (Eucure Biopharma) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой митазалимаб (Alligator Bioscience) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой ABBV-927 (AbbVie) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой сотигалимаб (Aprexigen) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой GEN1042 (Genmab) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой 2141 V-11 (Rockefeller University) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой селикрелумаб (Roche) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой SEA-CD40 (Seagen), которое представляет собой нефукозилированную гуманизованную версию мышиного S2C6 и содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 30-35 соответственно.

Соответствующие VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно. SEA-CD40 описан в патентных публикациях США № 2017/0333556 и 2017/0137528, обе из которых включены в данный документ в качестве ссылки.

[00206] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело, которое связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой SEA-CD70. См., например, патент США № 8067546; таблицу последовательностей в данном документе.

[00207] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело, которое связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой SEA-BCMA. См., например, публикацию США № 2017/0233484 и WO 2017/143069 (VH и VL SEQ ID NO: 13 и 19, соответственно; CDR SEQ ID NO: 60, 61, 62, 90, 91, 92, см. публикацию США № 2017/0233484); см. также таблицу последовательностей в данном документе (VH и VL SEQ ID NO: 45 и 46 соответственно; CDR SEQ ID NO: 47-52).

[00208] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело к интерлейкину-15.

[00209] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой ингибитор VTCN. В одном варианте осуществления ингибитор VTCN представляет собой FPA150 или его нефукозилированную версию.

[00210] В одном варианте осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело-антагонист к IDO. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор TIGIT. В определенных вариантах осуществления ингибитор TIGIT представляет собой антитело к TIGIT. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой MTIG7192A или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой BMS-986207 (BMS) или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой OMP-313M32 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой MK-7684. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AB154 или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой CGEN-15137 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой SEA-TGT. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой ASP8374 (Astellas) или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AJUD008 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AB308 (Arcus Biosciences) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AGEN1327 (Agenus) или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AK127 (Akeso

Biopharma) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой BAT6005 (Bio-Thera Solutions) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой BAT6021 (Bio-Thera Solutions) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой CASC-674 (Seagen) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой COM902 (CompuGen) или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой домваналимаб (Arcus Biosciences) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой этигилимаб (Mereo BioPharma) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой GSK4428859 (GSK) или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой HL186 (HanAll Biopharma) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой MIL-100 (Beijing Mabworks Biotech) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой YH-29143 (Yu Han) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой HLX53 (Shanghai Henlius Biotech) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой IBI939 (Innovent Biologics) или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой JS006 (Junshi Biosciences) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой M6223 (Merck KGaA) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой MG1131 (Mogam Institute) или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой оциперлимаб (BeiGene) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой тираголумаб (Roche; описан в патенте США № 10047158) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой TJT6 (I-Mab Biopharma) или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой вибостолимаб (MSD; описан в патенте США № 10618958) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой YBL-012 (Y Biologics) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой IBI-939 (Innovent) или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AZD2936 (AstraZeneca) или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой EOS-448 (iTeos/GSK) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой BAT6005 (Bio Thera) или его нефукозилированную версию. В еще

одном другом варианте осуществления ингибитор TIGIT представляет собой AGEN1777 (BMS/Agenus) или его нефукозилированную версию.

[00211] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор VSIR. В определенных вариантах осуществления ингибитор VSIR представляет собой антитело к VSIR. В одном варианте осуществления ингибитор VSIR представляет собой MTIG7192A или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор VSIR представляет собой CA-170 или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор VSIR представляет собой JNJ 61610588 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор VSIR представляет собой HMBD-002 или его нефукозилированную версию.

[00212] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор TIM3. В определенных вариантах осуществления ингибитор TIM3 представляет собой антитело к TIM3. В одном варианте осуществления ингибитор TIM3 представляет собой AJUD009 или его нефукозилированную версию.

[00213] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор CD25 (IL2RA). В определенных вариантах осуществления ингибитор CD25 (IL2RA) представляет собой антитело к CD25 (IL2RA). В одном варианте осуществления ингибитор CD25 (IL2RA) представляет собой даклизумаб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор CD25 (IL2RA) представляет собой базиликсимаб или его нефукозилированную версию.

[00214] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор IFNAR1. В определенных вариантах осуществления ингибитор IFNAR1 представляет собой антитело к IFNAR1. В одном варианте осуществления ингибитор IFNAR1 представляет собой анифролумаб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор IFNAR1 представляет собой сифалимуаб или его нефукозилированную версию.

[00215] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор CSF1R. В определенных вариантах осуществления ингибитор CSF1R представляет собой антитело к CSF1R. В одном варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой пексидартиниб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой эмактузумаб или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой кабирализумаб или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой ARRY-382 или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой BLZ945 или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор CSF1R

представляет собой AJUD010 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой AMG820 или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой IMC-CS4 или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой JNJ-40346527 или его нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой PLX5622 или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор CSF1R представляет собой FPA008 или его нефукозилированную версию.

[00216] В различных вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, обладает одной или более или всеми из следующих активностей в любой комбинации: 1) истощает Т-регуляторные (Treg) клетки, 2) активирует антигенпрезентирующие клетки (APC), 3) усиливает CD8 Т-клеточные ответы, 4) активирует костимулирующие рецепторы и/или 5) способствует высвобождению иммуноактивирующих цитокинов (таких как CXCL10 и/или IFN γ). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, способствует высвобождению иммуноактивирующих цитокинов (например, CXCL10 и IFN γ) в большей степени, чем иммуносупрессивные цитокины (такие как IL10 и/или MDC).

В. Примеры антител к TIGIT

[00217] В одном аспекте антитела, которые связываются с человеческим TIGIT (Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM), представлены в качестве антител к активатору иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления в контексте данного документа, антитело к TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и одним или двумя лигандами CD155 и CD112. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155 в ходе функционального биоанализа, позволяя происходить передаче сигналов CD155-CD226. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT проявляет синергизм с анти-PD-1 агентом (например, антитело к PD-1) или анти-PD-L1 агентом (например, анти-PD-L1 антителом). В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT для применения в данных способах представляет собой SEA-TGT, которое представляет собой нефукозилированное антитело IgG1, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 7, 10, 14, 17, 18 и 19 соответственно. Соответствующие VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 6, соответственно.

[00218] Авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что антитела к TIGIT с усиленной эффекторной функцией, такой как может быть достигнута с помощью нефукозилированных антител IgG1, истощают Treg-клетки и проявляют повышенную эффективность *in vivo*. Соответственно, в различных вариантах осуществления предусмотрены нефукозилированные антитела к TIGIT.

[00219] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, такое как

нефукозилированное антитело к TIGIT, связывается с высокой аффинностью с белком TIGIT человека (SEQ ID NO:218) или его частью. В некоторых вариантах осуществления антитело обладает аффинностью связывания (K_D) с TIGIT человека менее 5 нМ, менее 1 нМ, менее 500 пМ, менее 250 пМ, менее 150 пМ, менее 100 пМ, менее чем 50 пМ, менее 40 пМ, менее 30 пМ, менее 20 пМ или менее около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет аффинность связывания (K_D) с TIGIT человека менее чем 50 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет K_D для аффинности связывания с TIGIT человека в диапазоне от около 1 пМ до около 5 нМ, например, от около 1 пМ до около 1 нМ, от около 1 пМ до около 500 пМ, от около 5 пМ до около 250 пМ или от около 10 пМ до около 100 пМ.

[00220] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к связыванию с TIGIT человека с высокой аффинностью, нефукозилированное антитело к TIGIT проявляет перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака («макак») и/или TIGIT мыши. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с TIGIT мыши с аффинностью связывания (K_D) 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с TIGIT человека с K_D , равной 5 нМ или менее, и перекрестно реагирует с TIGIT мыши с K_D , равной 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое связывается с TIGIT человека, также проявляет перекрестную реактивность как с TIGIT яванского макака, так и с TIGIT мыши.

[00221] В некоторых вариантах осуществления перекрестную реактивность антитела определяют путем обнаружения специфического связывания антитела к TIGIT с TIGIT, который экспрессируется на поверхности клетки (например, клеточная линия, которая экспрессируется TIGIT человека, TIGIT яванского макака или TIGIT мыши, или первичная клетка, которая эндогенно экспрессирует TIGIT, например, первичные Т-клетки, которые эндогенно экспрессируют TIGIT человека, TIGIT яванского макака или TIGIT мыши). В некоторых вариантах осуществления связывание антитела и перекрестную реактивность антитела определяют путем определения специфического связывания антитела к TIGIT с очищенным или рекомбинантным TIGIT (например, очищенный или рекомбинантный TIGIT человека, очищенный или рекомбинантный TIGIT яванского макака или очищенный или рекомбинантный TIGIT мыши) или химерным белком, содержащим TIGIT (например, Fc-слитый белок, содержащий TIGIT человека, TIGIT яванского макака или TIGIT мыши, или His-меченный белок, содержащий TIGIT человека, TIGIT яванского макака или TIGIT мыши).

[00222] В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT, представленные в данном документе, ингибируют взаимодействие между TIGIT и лигандом CD155. В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT, представленные в данном документе, ингибируют взаимодействие между TIGIT и лигандом CD112. В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT, предложенные в данном документе, ингибируют взаимодействие между TIGIT и обоими лигандами CD155 и CD112.

[00223] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое

связывается с TIGIT человека, содержит последовательность вариабельной области легкой цепи или ее часть и/или последовательность вариабельной области тяжелой цепи или ее часть, полученные из любого из следующих антител, описанных в данном документе: клон 13, клон 13A, клон 13B, клон 13C или клон 13D. Аминокислотные последовательности CDR, вариабельного домена легкой цепи (VL) и вариабельного домена тяжелой цепи (VH) антител к TIGIT клона 13, клона 13A, клона 13B, клона 13C и клона 13D представлены в Таблица последовательностей ниже.

[00224] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит одно или более (например, одно, два, три, четыре, пять или шесть) из:

последовательности CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9;

последовательности CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13;

последовательности CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 и 16;

последовательности CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17;

последовательности CDR2 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и/или

последовательности CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

[00225] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9; последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или 16.

[00226] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит последовательность CDR1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; последовательность CDR2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и последовательность CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

[00227] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9; последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13; последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 или SEQ

ID NO:16; последовательность CDR1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; последовательность CDR2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; и последовательность CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

[00228] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности:

- (a) SEQ ID NO: 7, 10, 14, 17, 18 и 19, соответственно; или
- (b) SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 18 и 19, соответственно; или
- (c) SEQ ID NO: 9, 12, 15, 17, 18 и 19, соответственно; или
- (d) SEQ ID NO: 8, 13, 16, 17, 18 и 19, соответственно; или
- (e) SEQ ID NO: 8, 12, 16, 17, 18 и 19, соответственно.

[00229] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH, имеющая по меньшей мере 90% идентичности последовательности с эталонной последовательностью (например, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:5) содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативных замен), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с TIGIT человека и необязательно сохраняет способность блокировать связывание CD155 и/или CD112 с TIGIT.

[00230] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:6), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например,

консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с TIGIT человека и, необязательно, сохраняет способность блокировать связывание CD155 и/или CD112 с TIGIT.

[00231] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:5, и содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:5, и содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

[00232] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит:

(a) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6;

(b) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; или

(c) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; или

(d) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; или

(f) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

[00233] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:20, 21, 22, 23 и 24; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

[00234] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT для применения в данных способах представляет собой нефукозилированную версию антитела к TIGIT, раскрытого в US 2009/0258013, US 2016/0176963, US 2016/0376365 или WO 2016/028656.

С. Примеры антител к CD40

[00235] Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления антитело,

которое связывает активатор иммунных клеток, представляет собой антитело-агонист к CD40. Агонистические моноклональные антитела к CD40, включая дацетузумаб, продемонстрировали обнадеживающую клиническую активность в условиях монотерапии и комбинированной химиотерапии. Дацетузумаб продемонстрировал некоторую клиническую активность в исследовании фазы 1 при НХЛ и в исследовании фазы 2 при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma). См., например, Advani et al., *J. Clin. Oncol.* 27:4371-4377 (2009) и De Vos et al., *J. Hematol. Oncol.* 7:1-9 (2014). Кроме того, CP-870,893, гуманизированное антитело-агонист IgG2 к CD40, продемонстрировало обнадеживающую активность при показаниях к солидным опухолям в сочетании с паклитакселом, карбоплатином или гемцитабином. В этих исследованиях наблюдали активацию антигенпрезентирующих клеток, продукцию цитокинов и образование антигенспецифических Т-клеток. См., например, Beatty et al., *Clin. Cancer Res.* 19:6286-6295 (2013) и Vonderheide et al., *Oncoimmunology* 2:e23033 (2013).

[00236] В некоторых вариантах осуществления нефукозилированное антитело к CD40 предоставляется для применения в данных способах. В некоторых вариантах осуществления нефукозилированное антитело к CD40 представляет собой SEA-CD40, которое представляет собой нефукозилированную гуманизированную версию мышиного S2C6 и содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 30-35, соответственно. Соответствующие VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно. SEA-CD40 описан в патентных публикациях США № 2017/0333556 и 2017/0137528, обе из которых включены в данный документ в качестве ссылки. Первоначально S2C6 был выделен в виде мышиного моноклонального антитела против карциномы мочевого пузыря человека, обозначаемого в данном документе как mS2C6. См., например, Paulie et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 17:165-179 (1984). Антитело S2C6 является частичным агонистом сигнального пути CD40 и в некоторых вариантах осуществления обладает следующими активностями: связывание с белком CD40 человека, связывание с белком CD40 яванского макака, активация сигнального пути CD40, потенцирование взаимодействия CD40 с его лигандом, CD40L. См., например, патент США № 6946129.

[00237] S2C6 был гуманизирован, и это гуманизированное антитело упоминается в данном документе как гуманизированное S2C6 и, альтернативно, как дацетузумаб, который представляет собой фукозилированное гуманизированное S2C6 (fhS2C6 или SGN-40). См., например, WO 2006/128103, которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели. SEA-CD40 представляет собой нефукозилированное гуманизированное антитело S2C6. Другие варианты гуманизированного S2C6 раскрыты в WO 2008/091954; они могут быть нефукозилированными и использоваться в раскрытых в данном документе способах.

[00238] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит одно или более (например, одно, два, три, четыре, пять или шесть) из:

последовательности CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30;

последовательности CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO: 36;

последовательности CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32;

последовательности CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33;

последовательности CDR2 легкой цепи, включающей SEQ ID NO:34; и/или

последовательности CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[00239] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30; последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO:36; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

[00240] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит последовательность CDR1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; последовательность CDR2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и последовательность CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[00241] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO:36; последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; и последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

[00242] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности:

(a) SEQ ID NO: 30, 31, 33, 34 и 35, соответственно; или

(b) SEQ ID NO: 30, 36, 33, 34 и 35, соответственно.

[00243] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности

последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH, по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:28), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с CD40 человека.

[00244] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:29. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:29), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с CD40 человека.

[00245] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 28, и содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:29. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

[00246] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, раскрытые как

SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD40 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, описанные как SEQ ID NO: 26 и 27 соответственно.

D. Примеры антител к CD70

[00247] В некоторых вариантах осуществления нефукозилированное антитело к CD70 предоставляется для применения в данных способах в качестве антитела, которое связывает активатор иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления нефукозилированное антитело к CD70 представляет собой SEA-CD70, как описано в патенте США № 8067546, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53-58 соответственно. Соответствующие VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно. Молекула CD70 является членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF) (TNFSF) и связывается с родственным рецептором CD27 (TNFRSF7). Взаимодействие между двумя молекулами активирует внутриклеточные сигналы от обоих рецепторов. В нормальных условиях экспрессия CD70 носит временный характер и ограничивается активированными Т- и В-клетками, зрелыми дендритными клетками и естественными киллерами (NK). Точно так же CD27 экспрессируется как на наивных, так и на активированных эффекторных Т-клетках, а также на NK и активированных В-клетках. Однако CD70 также aberrantly экспрессируется при различных гематологических раковых заболеваниях, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) и неходжкинскую лимфому (НХЛ), а также карциномы, и играет роль как в выживании опухолевых клеток, так и/или в уклонении опухоли от иммунного ответа. SEA-CD70 действует посредством блокирования передачи сигналов оси CD70/CD27, вызывая антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), а также усиливая антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

[00248] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит одно или более (например, одно, два, три, четыре, пять или шесть) из:

последовательности CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53;

последовательности CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54;

последовательности CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55;

последовательности CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56;

последовательности CDR2 легкой цепи, включающей SEQ ID NO:57; и/или

последовательности CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58.

[00249] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55.

[00250] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит последовательность CDR1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; последовательность CDR2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57; и последовательность CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58.

[00251] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54; последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57; и последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58.

[00252] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:41. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH, по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:41), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с CD70 человека.

[00253] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, по меньшей мере на 90%

идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:42), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с CD70 человека.

[00254] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94% , по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 41, и содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42.

[00255] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, раскрытые как SEQ ID NO: 41 и 42 соответственно.

Е. Примеры антител к ВСМА

[00256] В некоторых вариантах осуществления нефукозилированное антитело к ВСМА предоставляется для применения в данных способах в качестве антитела, которое связывает активатор иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления нефукозилированное антитело к ВСМА представляет собой SEA-ВСМА, которое представляет собой антитело, нацеленное на антиген созревания В-клеток (ВСМА), и содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 47-52 соответственно. Соответствующие VH и VL содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45 и 46, соответственно. ВСМА экспрессируется при множественной миеломе (ММ). Антитело действует посредством блокирования опосредованной лигандом передачи сигналов клеток ВСМА, антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и усиленной антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

[00257] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит одно или более (например, одно, два, три, четыре, пять или шесть) из:

последовательности CDR1 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47;

последовательности CDR2 тяжелой цепи, включающей аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:48;

последовательности CDR3 тяжелой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49;

последовательности CDR1 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50;

последовательности CDR2 легкой цепи, включающей SEQ ID NO:51; и/или

последовательности CDR3 легкой цепи, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

[00258] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47; последовательность CDR2 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49.

[00259] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит последовательность CDR1 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; последовательность CDR2 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51; и последовательность CDR3 легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

[00260] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51; и последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52.

[00261] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH, по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:45), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с ВСМА человека.

[00262] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:46. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:46), содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с ВСМА человека.

[00263] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 45, и содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:46. В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46.

[00264] В некоторых вариантах осуществления антитело к ВСМА содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, раскрытые как SEQ ID NO: 45 и 46 соответственно.

F. Усовершенствованный каркас Fc

[00265] Как отмечалось выше, антитела, которые связываются с активатором иммунных клеток, содержат Fc, обладающий одной или более из следующих активностей: усиленное связывание с одним или более активирующими FcγR; сниженное связывание с ингибиторными FcγR; усиленная активность ADCC; и/или повышенная активность ADCP. Антитела, содержащие Fc с такой активностью и желаемым профилем активности, могут быть получены различными способами, включая получение нефукозилированного белка и/или путем конструирования Fc, содержащего определенные мутации, которые обеспечивают желаемую активность. В этом разделе представлены дополнительные

сведения о методах получения нефукозилированных антител и примерные инженерные подходы. Дополнительные рекомендации по выбору константных областей и производству антител приведены в других разделах ниже.

[00266] Антитела могут быть гликозилированы в консервативных положениях их константных областей (Jefferis and Lund, (1997) *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, (1997) *TibTECH* 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, (1990) *Biochem.* 29:4175-4180), и внутримолекулярное взаимодействие между частями гликопротеина, которое может влиять на конформацию и представление трехмерной поверхности гликопротеина (Jefferis and Lund, выше; Wyss and Wagner, (1996) *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Олигосахариды также могут служить для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основе специфических структур распознавания. Например, сообщалось, что в агалактозилированном IgG олигосахаридная часть «выбрасывается» из пространства между CH₂, и концевые остатки N-ацетилглюкозамина становятся доступными для связывания маннозо-связывающего белка (Malhotra *et al.*, (1995) *Nature Med.* 1:237-243). Удаление гликопептидазой олигосахаридов из САМРАТН-1Н (рекомбинантное гуманизованное мышинное моноклональное антитело IgG1, которое распознает антиген CDw52 лимфоцитов человека), продуцируемого в клетках яичника китайского хомячка (CHO), приводило к полному снижению комплемент-опосредованного лизиса (CMCL) (Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318), в то время как селективное удаление остатков сиаловой кислоты с помощью нейраминидазы не привело к потере DMCL. Также сообщалось, что гликозилирование антител влияет на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, сообщалось, что клетки CHO с регулируемой тетрациклином экспрессией $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), гликозилтрансферазы, катализирующей образование делящегося пополам GlcNAc, улучшают активность ADCC (Umana *et al.* (1999) *Mature Biotech.* 17:176-180).

[00267] Гликозилирование антител, как правило, является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикамнокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

[00268] Варианты гликозилирования антител представляют собой варианты, в которых характер гликозилирования антител изменен. Под изменением понимается

удаление одной или более углеводных частей, обнаруженных в антителе, добавление одной или более углеводных частей к антителу, изменение состава гликозилирования (паттерна гликозилирования), степени гликозилирования и т.д.

[00269] Добавление сайтов гликозилирования к антителу можно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение может также быть выполнено путем добавления одного или более остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела или замещения ими (для сайтов O-связанного гликозилирования). Аналогичным образом, удаление сайтов гликозилирования могут осуществлять путем изменения аминокислоты внутри исходных сайтов гликозилирования антитела.

[00270] Аминокислотная последовательность обычно изменяется путем изменения основной последовательности нуклеиновой кислоты. Эти методы включают выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или не-вариантной версии антитела.

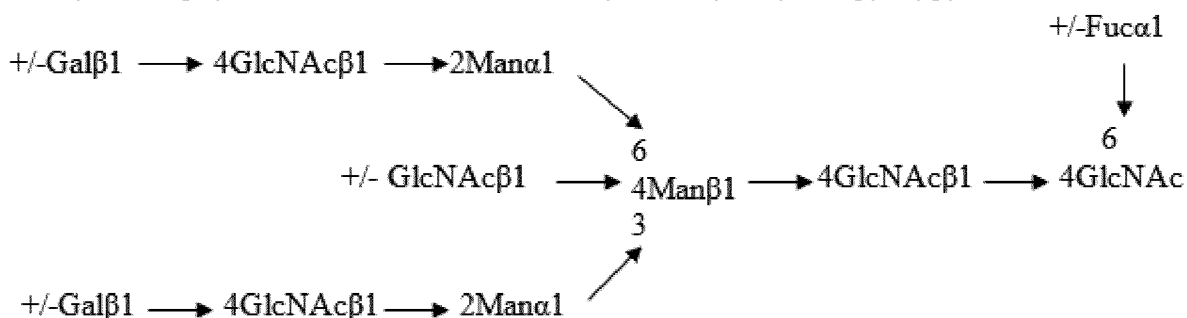
[00271] Гликозилирование (включая характер гликозилирования) антител также может быть изменено без изменения аминокислотной последовательности или основной нуклеотидной последовательности. См., например, Pereira et al., 2018, *MAbs*, 10(5): 693-711. Гликозилирование в значительной степени зависит от клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клеток, используемый для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, например антител, в качестве потенциального терапевтического средства, редко является нативной клеткой, можно ожидать значительных вариаций в характере гликозилирования антител. См., например, Hse et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070. В дополнение к выбору клеток-хозяев факторы, влияющие на гликозилирование во время рекомбинантной продукции антител, включают режим роста, состав среды, плотность культуры, оксигенацию, pH, схемы очистки и т.п. Были предложены различные методы изменения характера гликозилирования, достигаемого в конкретном организме-хозяине, включая введение или сверхэкспрессию определенных ферментов, участвующих в продукции олигосахаридов (патенты США № 5047335; 5510261; 5278299). Гликозилирование или определенные типы гликозилирования можно ферментативно удалить из гликопротеина, например, с помощью эндогликозидазы Н (Эндо Н). Кроме того, рекомбинантная клетка-хозяин может быть генетически сконструирована, например, сделана дефектной в процессинге определенных типов полисахаридов. Эти и подобные методы известны в данной области техники.

[00272] Структуру гликозилирования антител можно легко проанализировать с помощью обычных методов анализа углеводов, включая лектиновую хроматографию, ЯМР, масс-спектрометрию, ВЭЖХ, ГПХ, анализ состава моносахаридов, последовательное ферментативное расщепление и НРАЕС-РАD, в котором используется анионообменная

хроматография с высоким рН для отдельных олигосахаридов в зависимости от заряда. Способы высвобождения олигосахаридов для аналитических целей также известны и включают, помимо прочего, ферментативную обработку (обычно проводимую с использованием пептид-N-гликозидазы F/эндо-β-галактозидазы), элиминацию с использованием жесткой щелочной среды для высвобождения в основном O-связанных структур и химические методы с использованием безводного гидразина для высвобождения как N-, так и O-связанных олигосахаридов

[00273] Предпочтительной формой модификации гликозилирования антител является уменьшенное коровое фукозилирование. «Коровое фукозилирование» относится к присоединению фукозы («фукозилирование») к N-ацетилглюкозамину («GlcNAc») на восстанавливаемом конце N-связанного гликана.

[00274] «Сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом», обычно связана с аспарагином 297 (согласно нумерации Kabat). Используемый в данном документе термин «сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом» представляет собой двухантенную составную сахарную цепь, в основном имеющую следующую структуру:



где +указывает, что молекула сахара может присутствовать или отсутствовать, а числа указывают на положение связей между молекулами сахара. В приведенной выше структуре конец сахарной цепи, который связывается с аспарагином, называется восстанавливающим концом (справа), а противоположная сторона называется невосстанавливающим концом. Фукоза обычно связана с N-ацетилглюкозамин («GlcNAc») восстанавливающего конца, как правило, с помощью α1,6-связи (6-е положение GlcNAc связано с 1-м положением фукозы). «Gal» относится к галактозе, а «Man» относится к маннозе.

[00275] «Сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом» включает 1) комплексный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет ноль, одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также обозначаемых как «gal-GlcNAc»), а невосстанавливающая концевая сторона gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, разделяющую пополам N-ацетилглюкозамин или т.п.; и 2) гибридный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет обе ветви сахарной цепи, связанной N-гликозидом с высоким содержанием маннозы, и сложной сахарной цепи, связанной N-гликозидом.

[00276] В некоторых способах, представленных в данном документе, лишь незначительное количество фукозы включается в сложную сахарную цепь (цепи),

связанную с N-гликозидом, антител. Например, в различных вариантах осуществления менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% антител в композиции имеют ядро, фукозилированное фукозой. В некоторых вариантах осуществления около 2% антител в композиции имеют коровое фукозилирование фукозой. В различных вариантах осуществления, когда менее 60% антител в композиции имеют ядро, фукозилированное фукозой, антитела в композиции могут называться «нефукозилированными» или «афукозилированными». В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител в композиции являются нефукозилированными.

[00277] В определенных вариантах осуществления только незначительное количество аналога фукозы (или метаболита, или продукта аналога фукозы) включено в сложную цепь(и) сахара, связанную с N-гликозидом. Например, в различных вариантах осуществления менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% антител имеют ядерное фукозилирование аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы. В некоторых вариантах осуществления около 2% антител имеют коровое фукозилирование аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы.

[00278] В некоторых вариантах осуществления менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% антител в композиции имеют остаток фукозы на гликановой структуре G0, G1 или G2. (См., например, Raju et al., 2012, MAbs 4: 385-391, Фиг. 3.) В некоторых вариантах осуществления около 2% антител в композиции имеют остаток фукозы в структуре гликана G0, G1 или G2. В различных вариантах осуществления, когда менее 60% антител в композиции имеют остаток фукозы в структуре гликана G0, G1 или G2, антитела в композиции могут называться «нефукозилированными». В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по крайней мере, 99% антител в композиции не имеют фукозы в структуре гликана G0, G1 или G2. Следует отметить, что гликаны G0 включают гликаны G0-GN. Гликианы G0-GN представляют собой моноантенарные гликаны с одним концевым остатком GlcNAc. Гликианы G1 включают гликаны G1-GN. Гликианы G1-GN представляют собой моноантенарные гликаны с одним концевым остатком галактозы. Гликианы G0-GN и G1-GN могут быть фукозилированными или нефукозилированными.

[00279] Можно использовать различные способы получения нефукозилированных антител. Примеры стратегий включают использование клеточных линий, в которых

отсутствуют определенные биосинтетические ферменты, участвующие в путях фукозилирования, или ингибирование или нокаут определенных генов, участвующих в путях фукозилирования. Обзор таких подходов представлен Pereira, et al. (2018) *MABS* 10:693-711, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[00280] Например, способы получения нефукозилированных антител путем инкубации клеток, продуцирующих антитела, с аналогом фукозы описаны, например, в WO 2009/135181. Вкратце, клетки, сконструированные для экспрессии антител, инкубируют в присутствии аналога фукозы или внутриклеточного метаболита или продукта аналога фукозы. Внутриклеточный метаболит может быть, например, аналогом, модифицированным GDP, или аналогом, полностью или частично деэтерифицированным. Продукт может быть, например, полностью или частично деэтерифицированным аналогом. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы может ингибировать фермент(ы) в пути утилизации фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фукокиназы или GDP-фукозопирофосфорилазы. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) ингибирует фукозилтрансферазу (предпочтительно 1,6-фукозилтрансферазу, например, белок FUT8). В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фермента в пути синтеза фукозы *de novo*. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность GDP-маннозо-4,6-дегидратазы и/или GDP-фукозосинтетазы. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать переносчик фукозы (например, переносчик GDP-фукозы).

[00281] В одном варианте осуществления аналог фукозы представляет собой 2-фторфукозу. Методы использования аналогов фукозы в питательной среде и других аналогов фукозы раскрыты, например, в WO 2009/135181, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00282] Другие методы конструирования клеточных линий для уменьшения фукозилирования сердцевины включали нокауты генов, нокины генов и РНК-интерференцию (РНКи). См., например, Pereira et al., 2018, *Mabs*, 10(5): 693-711. При нокауте гена инактивируется ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа-1,6-фукозилтрансферазы). FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка из GDP-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. Сообщается, что FUT8 является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы к N-связанному биантеннарному углеводу в Asn297. Генные нокины добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или альфа-маннозидаза Гольджи II. Повышение уровня таких ферментов в клетках отклоняет моноклональные антитела от пути фукозилирования (что приводит к снижению корового фукозилирования) и увеличивает количество расщепляющих N-ацетилглюкозаминов. РНКи обычно также нацелена на экспрессию гена

FUT8, что приводит к снижению уровня транскриптов мРНК или полному отключению экспрессии гена.

[00283] Другие стратегии, которые могут быть использованы, включают GlycoMAb® (Патент США № 6602684) и Potelligent® (BioWa).

[00284] Любой из этих методов можно использовать для создания клеточной линии, способной продуцировать нефукозилированные антитела.

[00285] Также можно использовать различные инженерные подходы для получения областей Fc с желаемой активностью FcγR и эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления Fc сконструирован так, чтобы иметь следующую комбинацию мутаций: S239D, A330L и I332E, которая увеличивает аффинность домена Fc к FcγRIIIa и, следовательно, увеличивает ADCC. Дополнительные замены, повышающие аффинность к FcγRIIIa, включают, например, T256A, K290A, S298A, E333A и K334A. Замены, которые усиливают связывание с активирующим FcγRIIIa и снижают связывание с ингибиторным FcγRIIIb, включают, например, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L. В некоторых вариантах осуществления замены находятся в каркасе Fc IgG1.

[00286] Олигосахариды, ковалентно связанные с консервативным Asn297, участвуют в способности области Fc IgG связывать FcγR (Lund *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 157:4963-69; Wright and Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.* 15:26-31). Разработка этой гликоформы на IgG может значительно улучшить IgG-опосредованную ADCC. Добавление разделяющих модификаций N-ацетилглюкозамина (Umana *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotech. Bioeng.* 74:288-94) к этой гликоформе или удаление фукозы (Shields *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40; Shinkawa *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604; Niwa *et al.*, 2004, *Cancer Res.* 64:2127-33) из этой гликоформы являются двумя примерами инженерии IgG Fc, которая улучшает связывание между IgG Fc и FcγR, тем самым усиливая Ig-опосредованную активность ADCC.

[00287] Системная замена экспонированных растворителем аминокислот Fc-области IgG1 человека привела к образованию вариантов IgG с измененной аффинностью связывания FcγR (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). По сравнению с исходным IgG1 подмножество этих вариантов, включающее замены в Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333/Lys334 на Ala, демонстрирует повышенную как аффинность связывания в отношении FcγR, так и активность ADCC (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49).

[00288] Доступно множество методов для определения степени фукозилирования антитела. Методы включают, например, ЖХ-МС с помощью хроматографии PLRP-S, квадрупольную ТОФ-МС с ионизацией электрораспылением, капиллярный электрофорез с лазерно-индуцированной флуоресценцией (CE-LIF), и хроматографию гидрофильных взаимодействий с флуоресцентным детектированием (HILIC).

IV. ПРИМЕРЫ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

(ADC)

[00289] В предыдущем разделе описаны соответствующие аспекты антитела, которое связывается с мишенью, участвующей в иммунной регуляции (активатор иммунных клеток). Как отмечалось выше, некоторые из представленных в данном документе способов также включают введение конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего разрушитель тубулина (например, ауристатина, включая, например, MMAE и MMAF) в сочетании с антителом, которое связывается с активатором иммунных клеток. В различных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с антигеном, экспрессированным на опухолевой клетке. Дополнительные подробности, касающиеся ADC, который используется в способах, представленных в данном документе, изложены в этом разделе и в приведенных ниже примерах. Любой из ADC, описанных в данном документе, можно комбинировать с любым из антител, которые связывают активатор иммунных клеток, описанный в данном документе.

А. Иллюстративные целевые антигены

[00290] В некоторых вариантах осуществления ADC связывается с антигеном, экспрессированным на опухолевой клетке.

[00291] В некоторых вариантах осуществления ADC, используемый в способах, представленных в данном документе, содержит антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, при этом указанное антитело специфически связывает антиген, выбранный из 5T4 (TPBG), ADAM-9, AG-7, ALK, ALP, AMHRII, APLP2, ASCT2, AVB6, AXL (UFO), B7-H3 (CD276), B7-H4, BCMA, C3a, C3b, C4.4a (LYPD3), C5, C5a, CA6, CA9, CanAg, карбоангидразы IX (CAIX), катепсина D, CCR7, CD1, CD10, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD111, CD112, CD113, CD116, CD117, CD118, CD119, CD11A, CD11b, CD11c, CD120a, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD13, CD130, CD131, CD132, CD133, CD135, CD136, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD146, CD147, CD148, CD15, CD150, CD151, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b2, CD158e, CD158f1, CD158h, CD158i, CD159a, CD16, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD166, CD167b, CD169, CD16a, CD16b, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD18, CD180, CD181, CD183, CD184, CD185, CD19, CD194, CD197, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD20, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD208, CD21, CD213a1, CD213a2, CD217, CD218a, CD22, CD220, CD221, CD222, CD224, CD226, CD228, CD229, CD23, CD230, CD232, CD239, CD243, CD244, CD248, CD249, CD25, CD26, CD265, CD267, CD269, CD27, CD272, CD273, CD274, CD275, CD279, CD28, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD289, CD29, CD294, CD295, CD298, CD3, CD3 эпсилон, CD30, CD300f, CD302, CD304, CD305, CD307, CD31, CD312, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD32, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD32b, CD33, CD331,

CD332, CD333, CD334, CD337, CD339, CD34, CD340, CD344, CD35, CD352, CD36, CD37, CD38, CD39, CD3d, CD3g, CD4, CD41, CD42d, CD44, CD44v6, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD5, CD50, CD51, CD51 (интегрин альфа-V), CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD6, CD61, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD66a-e, CD67, CD68, CD69, CD7, CD70, CD70L, CD71, CD71 (TfR), CD72, CD73, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD82, CD83, CD84, CD85f, CD85i, CD85j, CD86, CD87, CD89, CD90, CD91, CD92, CD95, CD96, CD97, CD98, CDH6, CDH6 (кадгерин 6), CDw210a, CDw210b, CEA, CEACAM5, CEACAM6, CFC1B, cKIT, CLDN18.2 (клаудин 18.2), CLDN6, CLDN9, CLL-1, c-MET, факторов комплемента C3, Cripto, CSP-1, CXCR5, DCLK1, DLK-1, DLL3, DPEP3, DR5 (рецептора смерти 5), дисадгерин, EFNA4, EGFR, EGFR дикого типа, EGFRviii, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, EMP2, ENPP3, EphCAM, EphA2, EphA3, эфрина-A4 (EFNA4), ETBR, FAP, FcRH5, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR, FOLR1, FOLR-альфа, FSH, GCC, GD2, GD3, globo H, GPC1, GPC-1, GPC3, GPNMB, GPR20, HER2, HER-2, HER3, HER-3, HGFR (c-Met), HLA-DR, HM1.24, HSP90, Ia, IGF-1R, IL-13R, IL-15, IL1RAP, IL-2, IL-3, IL-4, IL7R, интегрин альфаVбета 3 (интегрин $\alpha V\beta 3$), интегрин бета-6, рецептор интерлейкина-4 (IL4R), KAAG-1, KLK2, LAMP-1, Le(y), антигена Льюиса Y, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH, липидного рафта, LIV-1 (SLC39A6 или ZIP6), LRP-1, LRRC15, LY6E, рецептора маннозы макрофага 1, MAGE, мезотелина (MSLN), MET, белка A, родственного цепи МНС класса I, и B (MICA и MICB), MN/CA IX, MRC2, MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC1, MUC16, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC5ac, NaPi2b, NCA-90, NCA-95, нектин-4, Notch3, нуклеолина, OAcGD2, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), OX001L, P1GF, антигена PAM4, p-кадгерин (кадгерин 3), PD-L1, фосфатидилсерин (PS), PRLR, рецептора пролактина (PRLR), белков псевдомонад, PSMA, PTK4, PTK7, рецепторной тирозинкиназы (RTK), RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SEZ6, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, SLMAMF7 (CS1), SLTRK6, сортилина (SORT1), SSEA-4, SSTR2, Staphylococcus aureus (антибиотика), STEAP-1, STING, STn, T101, TAA, TAC, TDGF1, тенасцин, TENB2, TGF- β , антигенов Томсона-Фриденрайха, Thy1.1, TIM-1, тканевого фактора (TF; CD142), TM4SF1, антигена Tn, ФНО-альфа (ФНО α), TRA-1-60, рецептора TRAIL (R1 и R2), TROP-2, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), uPAR, VEGFR, VEGFR-2 и xCT.

[00292] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный из EGFR, KAAG1, MET, CD30, HER2, CD30, IL7R, CD248, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), MRC2, EGFR, CD71, TRA-1-60, STn, CLDN18.2, CLDN6, HER-2, CD33, CD7, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), TRA-1-60, TIM-1, GCC, мезотелина (MSLN), EGFR, gpNMB, CD20, AMHR2, NaPi2b, CD142, ROR1, интегрин бета-6, Ly6E, cMET, CD37, MUC16, STEAP-1, LRRC15, SLITRK6, MUC16, ETBR, FCRH5, Ax1, CD79b, Globo H, SLAMF7, PSMA, CD22, CD228, CD48, LIV-1, EphA2, SLC44A4, CA9, Ax1 и LGR5.

[00293] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный из BCMA, GPC1, CD30, cMET, SAIL, HER3, CD70, c-MET, CD46, HER2, 5T4, ENPP3, CD19, EGFR, BCMA, CD70, BCMA и EphA2.

[00294] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный

из Her2, TROP2, BCMA, cMet, интегрин альфаVбета6 (интегрин $\alpha V\beta 6$), CD22, CD79b, CD30, CD19, CD70, CD228 и CD47.

[00295] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный из CD142, интегрин бета-6, ENPP3, CD19, Ly6E, cMET, C4.4a, CD37, MUC16, STEAP-1, LRRC15, SLITRK6, MUC16, ETBR, FCRH5, Ax1, EGFR, CD79b, BCMA, CD70, PSMA, CD79b, CD228, CD48, LIV-1, EphA2, SLC44A4, CD30 и sTn.

[00296] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный из 5T4, ADAM-9, AG-7, ALK, AMHRII, APLP2, ASCT2, Ax1, B7-H3, B7-H4, BCMA, C4.4a, CA6, CA9, CanAg, карбоангидразы IX (CAIX), катепсина D, CCR7, CD103, CD123, CD133, CD138, CD142, CD147, CD16, CD166, CD184, CD19, CD20, CD205, CD206, CD22, CD228, CD248, CD25, CD3, CD3 эпсилон, CD30, CD300f, CD317, CD33, CD352, CD37, CD38, CD44v6, CD45, CD46, CD47, CD48, CD51, CD56, CD7, CD70, CD71, CD74, CD79b, CDH6, CEA, CEACAM5, CEACAM6, cKIT, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, CLL-1, c-MET, Cripto, CSP-1, CXCR5, DCLK1, DLK-1, DLL3, DPEP3, DR5 (рецептора смерти 5), дисадгерина, EFNA4, EGFR, EGFR дикого типа, EGFRviii, EMP2, ENPP3, EpCAM, EphA2, EphA3, ETBR, FAP, FCRH5, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR, FOLR-альфа, FSH, GCC, GD2, GD3, globo H, GPC-1, GPC3, gpNMB, GPR20, HER-2, HER-3, HLA-DR, HSP90, IGF-1R, IL-13R, IL-15, IL1RAP, IL-2, IL-3, IL-4, IL7R, интегрин бета-6, рецептора интерлейкина-4 (IL4R), KAAG-1, KLK2, LAMP-1, антигена Льюиса Y, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH, липидных рафтов, LIV-1, LRP-1, LRRC15, Ly6E, маннозного рецептора макрофагов 1, MAGE, мезотелина (MSLN), MET, белков А и В, родственной цепи МНС класса I (MICA и MICB), MRC2, MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC-1, MUC16, NaPi2b, Nectin-4, NOTCH3, нуклеолина, OAcGD2, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), OX001L, P-кадгерина, PD-L1, фосфатидилсерина, фосфатидилсерина (PS), рецептора пролактина (PRLR), белков Pseudomonas, PSMA, PTK7, рецепторной тирозинкиназы (RTK), RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SEZ6, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, сортилин (SORT1), SSEA-4, SSTR2, Staphylococcus aureus (антибиотика), STEAP-1, STING, STING (цели полезной нагрузки), STn, TAA, TGF- β , TIM-1, TM4SF1, TNF-альфа, TRA-1-60, TROP-2, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), VEGFR-2, xCT.

[00297] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный из AMHRII, Ax1, CA9, CD142, CD20, CD22, CD228, CD248, CD30, CD33, CD7, CD48, CD71, CD79b, CLDN18.2, CLDN6, c-MET, EGFR, EphA2, ETBR, FCRH5, GCC, Globo H, gpNMB, HER-2, IL7R, интегрин бета -6, KAAG-1, LGR5, LIV-1, LRRC15, Ly6E, мезотелина (MSLN), MET, MRC2, MUC16, NaPi2b, нектин-4, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), PSMA, ROR1, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, STEAP-1, STn, TIM-1, TRA-1-60, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72).

[00298] В некоторых вариантах осуществления ADC связывает антиген, выбранный из BCMA, GPC-1, CD30, c-MET, SAIL, HER-3, CD70, CD46, HER-2, 5T4, ENPP3, CD19, EGFR, EphA2.

[00299] В некоторых вариантах осуществления антитело ADC не связывает нектин-

4.

[00300] Как правило, антитело ADC и антитело, которое связывает активатор иммунной клетки, представляют собой два отдельных антитела. Однако в определенных вариантах осуществления антитела могут образовывать биспецифические антитела.

В. Примеры цитотоксических агентов

[00301] В различных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают введение конъюгата антитело-лекарственное средство, причем конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антитело, конъюгированное с агентом, разрушающим тубулин.

[00302] В данной области известны различные категории агентов, разрушающих тубулин, включая, но не ограничиваясь ими, доластатины, ауристатины, тубулизины, колхицин, алкалоиды барвинка, таксаны, Т67 (Туларик), криптофицины, майтансиноиды, гемиастерлины и другие агенты, разрушающие тубулин.

[00303] Ауристатины являются производными природного продукта доластатина. Примеры ауристатинов включают доластатин-10, ауристатин E, ауристатин T, MMAE (N-метилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-норэфедрин или монометилауристатин E) и MMAF (N-метилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин или довалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин), AEB (эфир, полученный реакцией ауристатина E с параацетилбензойной кислотой), AEBV (эфир, полученный реакцией ауристатина E с бензоилвалериановой кислотой) и AFP (диметилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин-п-фенилендиамин или ауристатин фенилаланин фенилендиамин). WO 2015/057699 описывает пегилированные ауристатины, включая MMAE. Дополнительные производные доластатина, предполагаемые для использования, раскрыты в патенте США № 9345785, включенном в данный документ посредством ссылки для любой цели. Типичные варианты осуществления ауристатина включают соединенные с N-концом монометилауристиновые единицы лекарственного средства DE и DF, раскрытые в Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, представленной 28 марта 2004 г., и описаны в публикации патента США № 2005/0238649, раскрытие которой полностью включено посредством ссылки.

[00304] В определенных вариантах осуществления цитотоксический агент ADC представляет собой MMAE.

[00305] В других вариантах осуществления цитотоксический агент, конъюгированный с ADC, представляет собой MMAF.

[00306] Тубулизины включают, но не ограничиваются ими, тубулизин D, тубулизин M, тубуфенилаланин и тубутирозин. WO 2017-096311 и WO 2016-040684 описывают неограничивающие аналоги тубулизина, включая тубулизин M.

[00307] Колхицины включают, но не ограничиваются ими, колхицин и CA-4.

[00308] Алкалоиды барвинка включают, но не ограничиваются ими, винбластин (VBL), винорелбин (VRL), винкрестин (VCR) и виндфезин (VDS).

[00309] Таксаны включают, но не ограничиваются ими, Taxol[®] (паклитаксел) и

Taxotere® (доцетаксел).

[00310] Криптофицины включают, но не ограничиваются ими, криптофицин-1 и криптофицин-52.

[00311] Майтансиноиды включают, но не ограничиваются ими, майтанзин, майтансинол, аналоги майтанзина, DM1, DM3 и DM4 и ансаматоцин-2. Иллюстративные лекарственные компоненты майтанзиноиды включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, такое как: С-19-дехлор (патент США № 4256746) (полученный восстановлением ансамитоцина Р2 литий-алюминийгидридом); С-20-гидрокси (или С-20-деметил)+/-С-19-дехлор (патенты США № 4361650 и 4307016) (полученный деметилированием с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с использованием ЛАН); и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/- дехлор (патент США № 4294757) (полученный ацилированием с использованием ацилхлоридов) и имеющие модификации в других положениях

[00312] Фрагменты майтансиноидного лекарственного средства также включают модификации, такие как: С-9-SH (патент США № 4424219) (полученный реакцией майтансинола с H25 или P2S5); С-14-алкоксиметил(деметокси/CH2OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH 2 OH или CH 2 OAc) (патент США № 4450254) (получен от *Nocardia*); С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (получен превращением майтансинола *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделен из *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) (получен деметилированием майтансинола *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (патент США № 4371533) (получен восстановлением майтансинола трихлоридом титана/ЛАН). Цитотоксичность конъюгата ТА.1-майтансиноид, который связывает HER-2 (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)), тестировали *in vitro* на линии клеток рака молочной железы человека SK-BR-3. Конъюгат лекарственного средства достиг степени цитотоксичности, аналогичной свободному лекарственному средству майтансиноида, которая могла быть увеличена за счет увеличения количества молекул майтансиноида на молекулу антитела.

[00313] Гемиастерлины включают, но не ограничиваются ими, гемиастерлин и НТИ-286.

[00314] Другие агенты, разрушающие тубулин, включают таккалонолид А, таккалонолид В, таккалонолид АF, таккалонолид АJ, таккалонолид АI-эпоксид, дискодермолид, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и эпотилон В), нокодазол, колхицин, колцимид, эстрамустин, цемадотин, комбретастатины, дискодермолид, элеутеробин, эрибулин, пролаболин, фомопсин и лаулималид.

[00315] ADC для применения в способах по данному изобретению может, в некоторых вариантах осуществления, содержать линкерные единицы. Например, ADC может содержать линкерную область между цитотоксическим агентом и антителом. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, расщепляемый протеазой, линкер, расщепляемый кислотой, дисульфидный линкер или

самостабилизирующийся линкер. В различных вариантах осуществления линкер расщепляется во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает терапевтическое средство из антитела во внутриклеточную среду.

[00316] ADC для применения в способах по данному изобретению может содержать линкер, в котором терапевтический агент (например, разрушитель тубулина) может быть конъюгирован с антителом таким образом, что снижает его активность, если только он не отсоединяется от антитела (например, путем гидролиза, деградации антител или расщепляющего агента). Такой терапевтический агент может быть присоединен к антителу через линкер. Терапевтический агент, конъюгированный с линкером, также упоминается в данном документе как линкер лекарственного средства. Природа линкера может широко варьировать. Компоненты, входящие в состав линкера, выбирают на основе их характеристик, которые могут быть частично продиктованы условиями в месте доставки конъюгата.

[00317] Терапевтический агент может быть присоединен к антителу с помощью расщепляемого линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде клетки-мишени, но практически не чувствителен к внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от антитела, когда он интернализуется раковой клеткой (например, в эндосомах или, например, благодаря чувствительности к рН или чувствительности к протеазе, в лизосомальной среде или в кавеоларной среде). Терапевтический агент также может быть присоединен к антителу с помощью нерасщепляемого линкера.

[00318] Как указано, линкер может содержать расщепляемую единицу. В некоторых таких вариантах осуществления структура и/или последовательность расщепляемой единицы выбираются таким образом, чтобы она расщеплялась под действием ферментов, присутствующих в целевом сайте (например, в клетке-мишени). В других вариантах осуществления также могут быть использованы расщепляемые единицы, которые расщепляются при изменении рН (например, лабильные в кислоте или основании), температуре или при облучении (например, фотолabile).

[00319] В некоторых вариантах осуществления расщепляемая единица может содержать одну аминокислоту или непрерывную последовательность аминокислот. Аминокислотная последовательность может быть субстратом-мишенью для фермента.

[00320] В некоторых аспектах расщепляемая единица представляет собой пептидную единицу и имеет длину по меньшей мере две аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Наиболее типичными являются расщепляемые единицы, которые расщепляются ферментами, присутствующими в клетках-мишенях, т.е. расщепляемый ферментом линкер. Соответственно, линкер может быть расщеплен внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Например, можно использовать линкер, расщепляемый тиол-зависимой протеазой катепсином-В, которая в высокой степени экспрессируется в раковой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или пептид Val-Cit, или пептид Val-Ala).

[00321] В некоторых вариантах осуществления линкер будет содержать расщепляемую единицу (например, пептидильную единицу), и расщепляемая единица будет непосредственно конъюгирована с терапевтическим агентом. В других вариантах осуществления расщепляемая единица будет конъюгирована с терапевтическим агентом посредством дополнительной функциональной единицы, например, саморасщепляющейся спейсерной единицы или несаморасщепляющейся спейсерной единицы. Несаморасщепляющаяся спейсерная единица представляет собой единицу, в которой часть или вся спейсерная единица остается связанной с единицей лекарственного средства после отщепления расщепляемой единицы (например, аминокислоты) из конъюгата антитело-лекарственное средство. Чтобы высвободить лекарственное средство, внутри клетки-мишени происходит независимая реакция гидролиза, которая отщепляет спейсерную единицу от лекарственного средства.

[00322] С саморасщепляющуюся спейсерной единицей лекарственное средство высвобождается без необходимости в лекарственного средства для отдельной стадии гидролиза. В одном варианте осуществления, где линкер содержит расщепляемую единицу и саморасщепляющуюся группу, расщепляемая единица расщепляется под действием фермента, и после расщепления расщепляемой единицы саморасщепляющаяся группа(ы) высвобождает терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая единица линкера будет прямо или косвенно конъюгирована с терапевтическим агентом на одном конце, а на другом конце будет прямо или косвенно конъюгирована с антителом. В некоторых таких вариантах осуществления расщепляемая единица будет прямо или косвенно (например, через саморасщепляющуюся или несаморасщепляющуюся спейсерную единицу) конъюгирована с терапевтическим агентом на одном конце, а на другом конце будет конъюгирована с антителом через растягиваемую единицу. Растягиваемая единица связывает антитело с остальной частью лекарственного средства и/или линкером лекарственного средства. В одном варианте осуществления соединение между антителом и остальной частью лекарственного средства или линкером лекарственного средства осуществляется через малеимидную группу, например, через малеимидокапроильный линкер. В некоторых вариантах осуществления антитело будет связано с лекарственным средством через дисульфид, например дисульфид-связанные майтансиноидные конъюгаты SPDB-DM4 и SPP-DM1.

[00323] Связь между антителом и линкером может быть осуществлена несколькими различными путями, например, через тиоэфирную связь, через дисульфидную связь, через амидную связь или через сложноэфирную связь. В одном варианте осуществления соединение между антителом и линкером образуется между тиоловой группой цистеинового остатка антитела и малеимидной группой линкера. В некоторых вариантах осуществления межпочечные связи антитела превращаются в свободные тиоловые группы перед реакцией с функциональной группой линкера. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина введен в тяжелую или легкую цепь антитела и реагирует с линкером. Положения для вставки цистеина путем замещения в тяжелых или легких цепях

антитела включают положения, описанные в опубликованной заявке США № 2007-0092940 и международной патентной публикации WO 2008070593, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

[00324] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующую формулу I:



где L представляет собой антитело, LU представляет собой линкерную единицу, а D представляет собой единицу лекарственного средства (т.е. терапевтический агент). Индекс p находится в диапазоне от 1 до 20. Такие конъюгаты содержат антитело, ковалентно связанное по меньшей мере с одним лекарственным средством через линкер. Линкерная единица соединена одним концом с антителом, а другим концом с лекарственным средством.

[00325] Нагрузка лекарственного средства представлена p, числом молекул лекарственного средства на антитело. Нагрузка лекарственного средства может составлять от 1 до 20 фрагментов лекарственного средства (D) на антитело. В некоторых аспектах нижний индекс p будет находиться в диапазоне от 1 до 20 (т. е. как целые, так и нецелые значения от 1 до 20). В некоторых аспектах нижний индекс p будет представлять собой целое число от 1 до 20 и будет представлять количество линкеров лекарственного средства на отдельном антителе. В других аспектах p представляет собой среднее количество молекул лекарственного средство-линкер на антитело, например, среднее количество молекул лекарственного средство-линкер на антитело в реакционной смеси или композиции (например, фармацевтической композиции), и может быть целым или нецелым числом. Соответственно, в некоторых аспектах для композиций (например, фармацевтических композиций) p представляет собой среднюю нагрузку лекарственного средства конъюгатов антитело-лекарственное средство в композиции, и p находится в диапазоне от 1 до 20.

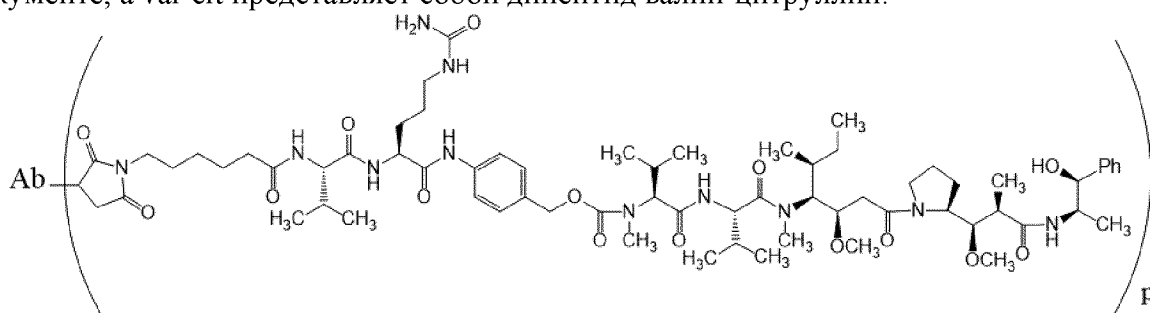
[00326] В некоторых вариантах осуществления p составляет от около 1 до около 8 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления p равно 1. В некоторых вариантах осуществления p равно 2. В некоторых вариантах осуществления p составляет от около 2 до около 8 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления p равно от около 2 до около 6, от 2 до около 5 или от 2 до около 4 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления p равно около 2, около 4, около 6 или около 8 лекарственных средств на антитело.

[00327] Среднее количество лекарственных средств на единицу антитела в препарате, полученном в результате реакции конъюгации, можно охарактеризовать с помощью обычных средств, таких как масс-спектроскопия, анализ ELISA, НИС и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение конъюгатов в единицах p.

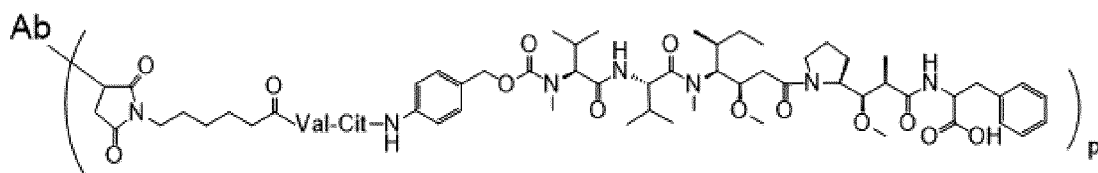
[00328] Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатиона, т.е. конъюгаты, в которых лекарственный компонент представляет собой лекарственное средство ауристин. Ауристатины связывают тубулин, препятствуют динамике микротрубочек,

ядерному и клеточному делению и обладают противораковой активностью. Как правило, конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатиона содержит линкер между лекарственным средством ауристатином и антителом. Ауристатины могут быть связаны с антителом в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Линкер может представлять собой, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый при деградации антитела). Ауристин может представлять собой ауристин E или его производное. Ауристин может представлять собой, например, сложный эфир, образованный ауристатином E и кетокислотой. Например, ауристин E можно вводить в реакцию с парацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с образованием AEB и AEVB соответственно. Другие типичные ауристатины включают MMAF (мометилауристин F) и MMAE (мометилауристин E). Синтез и структура иллюстративных ауристатинов описаны в патентах или публикациях США № 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

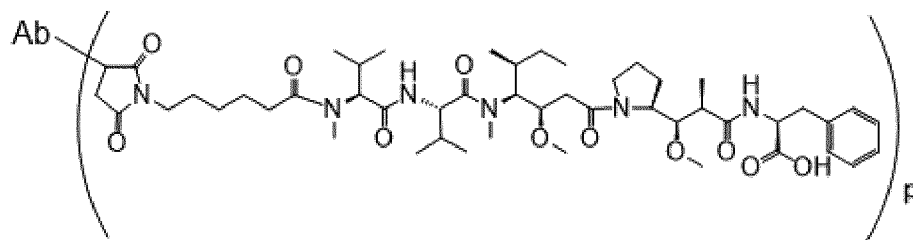
[00329] Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство на основе ауристатиона включают конъюгаты антитело-лекарственное средство vcMMAE, vcMMAF и mcMMAF, как показано ниже, где Ab представляет собой антитело, как описано в данном документе, а val-cit представляет собой дипептид валин-цитруллин:



Ab-vcMMAE



Ab-vcMMAF



Ab-mcMMAF

или его фармацевтически приемлемую соль. Нагрузка лекарственного средства представлена p , числом молекул лекарственного средства-линкер на антитело. В

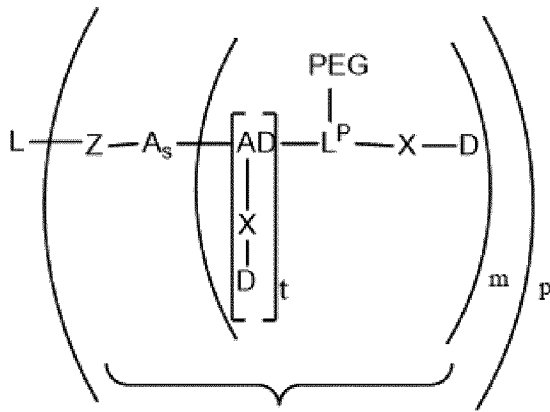
зависимости от контекста p может представлять собой среднее количество молекул лекарственного средства-линкера на антитело, также относящееся к средней нагрузке лекарственного средства. Переменная p находится в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно от 1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, когда p представляет собой среднюю дозу лекарственного средства, p находится в диапазоне от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления p равно около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых аспектах антитело конъюгировано с линкером через атом серы остатка цистеина. В некоторых аспектах остаток цистеина представляет собой тот, что встроен в антитело. В других аспектах остаток цистеина представляет собой остаток цистеина межцепочечного дисульфида.

[00330] В некоторых других вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство содержат линкерные единицы, раскрытые в заявке US20160310612A1 (PCT/US2014/060477), полностью включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых других вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующую формулу (II):



где D представляет собой единицу лекарственного средства, PEG представляет собой единицу полиэтиленгликоля, которая маскирует гидрофобность линкера лекарственного средства, L^{P} представляет собой параллельную соединительную единицу, которая позволяет единице ПЭГ находиться в параллельной ориентации по отношению к X-D, A представляет собой разветвляющую единицу, когда m больше 1, необязательно состоит из субъединиц, или A отсутствует, когда m равно 1, X представляет собой съемную сборочную единицу, которая обеспечивает отделение каждого D от LDC, а Z представляет собой необязательную спейсерную единицу, через которую L^{P} связывается с L, которая представляет собой антитело.

[00331] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующую формулу III:

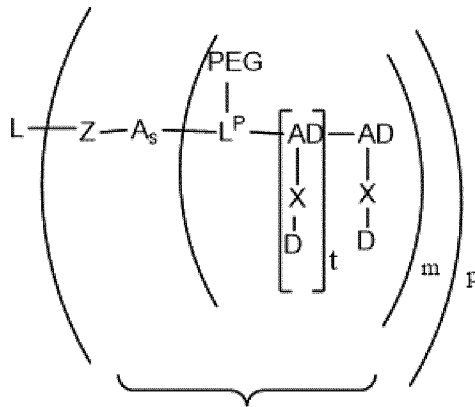


лекарственное средство - линкер

(III),

где AD представляет собой единицу присоединения лекарственного средства, которая позволяет дополнительно присоединять фрагменты X-D, обозначенные буквой t, в параллельной ориентации к единице PEG, а L, L^p, Z, A, X, D, m, p и s имеют значения, определенные для формулы II.

[00332] В еще одних других принципиальных вариантах осуществления LDC по данному изобретению представлен структурой Формулы IV, приведенной ниже:



лекарственное средство - линкер

(IV)

где AD, L, L^p, PEG, Z, A, X, D, m, p, s и t имеют значения, определенные для формулы III.

[00333] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующую формулу 1:



или его соль, в частности, фармацевтически приемлемая соль, где

L представляет собой антитело;

LU представляет собой линкерную единицу; и

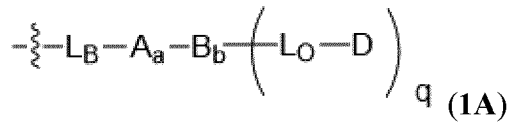
D' представляет собой от 1 до единиц лекарственного средства (D) в каждой линкерной части лекарственного средства формулы -LU-D'; и

нижний индекс p представляет собой число от 1 до 12, от 1 до 10 или от 1 до 8 или равно около 4 или около 8,

при этом антитело способно к селективному связыванию с антигеном опухолевой

ткани для последующего высвобождения лекарственной единицы в виде свободного цитотоксического агента,

где линкерный фрагмент лекарственного средства формулы -LU-D' в каждом из конъюгатов антитело-лекарственное средство композиции имеет структуру Формулы 1А:



или его соль, в частности, фармацевтически приемлемая соль,

где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение к L;

D представляет собой лекарственную единицу цитотоксического агента;

L_B представляет собой фрагмент ковалентного связывания антитела;

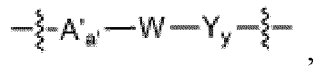
A представляет собой первую необязательную растягиваемую единицу;

индекс a равен 0 или 1, что указывает на отсутствие или присутствие A соответственно;

B является необязательной единицей ветвления;

индекс b равен 0 или 1, что указывает на отсутствие или присутствие B соответственно;

L_O представляет собой фрагмент вторичного линкера, где вторичный линкер имеет формулу;



где волнистая линия, примыкающая к Y, указывает место ковалентного присоединения L_O к единице лекарственного средства, а волнистая линия, примыкающая к A', указывает место ковалентного присоединения к остальной части линкерного фрагмента лекарственного средства;

A' представляет собой вторую необязательную растягиваемую единицу, которая в отсутствие B становится субъединицей A,

индекс a' равен 0 или 1, что указывает на отсутствие или присутствие A',

W представляет собой расщепляемую единицу пептида, где расщепляемая единица пептида представляет собой непрерывную последовательность до 12 (например, 3-12 или 3-10) аминокислот, где последовательность состоит из придающего селективность трипептида, который обеспечивает повышенную селективность воздействия на опухолевую ткань по сравнению с нормальной тканью свободного цитотоксического агента, высвобождаемого из конъюгата антитело-лекарственное средство композиции, по сравнению с цитотоксическим агентом, высвобождаемым из композиции конъюгата антитело-лекарственное средство компаратора композиции конъюгата антитело-лекарственное средство сравнения, в которой пептидная последовательность его расщепляемой пептидной единицы представляет собой дипептид -валин-цитруллин- или -валин-аланин-;

при этом опухоль и нормальные ткани принадлежат видам грызунов, и при этом

композиция Формулы 1 обеспечивает указанную повышенную избирательность воздействия, демонстрируемую:

сохранение эффективности в модели ксенотрансплантата опухоли сравнительной композиции конъюгата антитело-лекарственное средство при введении в том же самом эффективном количестве и режиме дозирования, которые ранее были определены для композиции сравнительного конъюгата антитело-лекарственное средство, и

демонстрируя снижение концентрации в плазме свободного цитотоксического агента, высвобождаемого из конъюгатов антитело-лекарственное средство композиции, и/или сохранение нормальных клеток в ткани при введении того же эффективного количества и схемы доз, что и в модели ксенотрансплантата опухоли, не несущей опухоль грызуна по сравнению с эквивалентным (например, таким же) введением композиции конъюгата антитело-лекарственное средство сравнения, при этом антитело обеих композиций конъюгата заменено несвязывающим антителом,

при этом цитотоксичность по отношению к клеткам ткани человека того же типа, что и к нормальным клеткам ткани грызуна, не являющегося носителем опухоли, по меньшей мере частично является причиной нежелательного явления у человека, которому вводят терапевтически эффективное количество композиции сравнения конъюгата;

Y представляет собой самоуничтожающийся спейсер; и

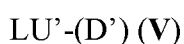
индекс y равен 0, 1 или 2, что указывает на отсутствие или наличие 1 или 2 Y соответственно;

индекс q представляет собой целое число от 1 до 4,

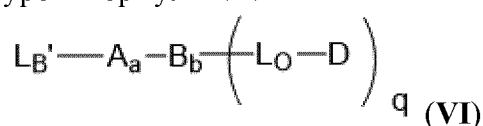
при условии, что нижний индекс q равен 1, когда нижний индекс b равен 0, и нижний индекс q равен 2, 3 или 4, когда нижний индекс b равен 1; и

при этом конъюгаты антитело-лекарственное средство композиции имеют структуру Формулы 1, в которой нижний индекс r заменен нижним индексом r', где нижний индекс r' представляет собой целое число от 1 до 12, от 1 до 10 или от 1 до 8, или равно 4 или 8.

[00334] Родственный вариант осуществления относится к линкеру лекарственного средства формулы V:



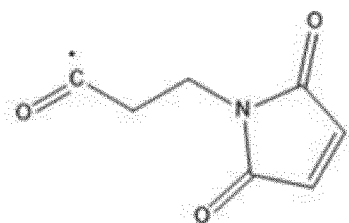
или его соли, в частности его фармацевтически приемлемой соли, где LU' способен образовывать ковалентную связь между L и LU формулы 1, и поэтому его иногда называют предшественником линкерной единицы; и D' представляет собой от 1 до 4 единиц лекарственного средства, где линкер лекарственного средства дополнительно определяется структурой Формулы VI:



где L_{B'} способен трансформироваться в L_B формулы VI, тем самым образуя ковалентную связь с L формулы 1, и поэтому его иногда называют предшественником

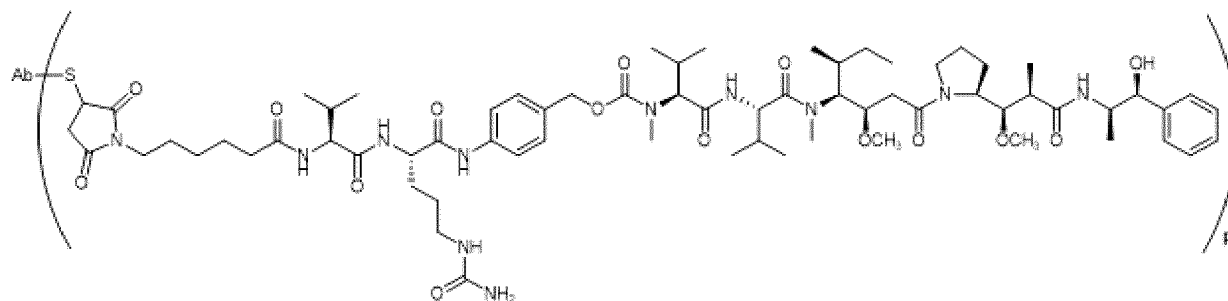
ковалентного связывания антитела, а остальные переменные группы формулы VI определены для формулы VI.

[00335] В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело (например, любое антитело, описанное в данном документе), конъюгированное с mc-vc-PABC-MMAE (также называемым в данном документе vcMMAE или 1006), mc-vc-PABC-MMAF, mc-MMAF, или mp-dLAE-PABC-MMAE (также обозначаемый в данном документе как dLAE-MMAE, mp-dLAE-MMAE или 7092), или его фармацевтически приемлемую соль. mp-dLAE-PABC-MMAE описан в публикации РСТ № WO 2021/055865 А1. Такие ADC показаны ниже, где Ab представляет собой антигенсвязывающий белок (например, любое антитело, как описано в данном документе), mc представляет собой малеимидокапроильную группу, mp представляет собой малеимидопропионильную

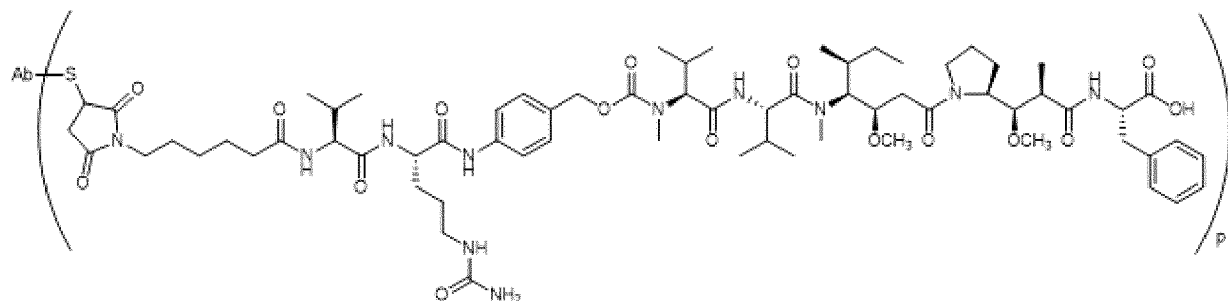


группу:

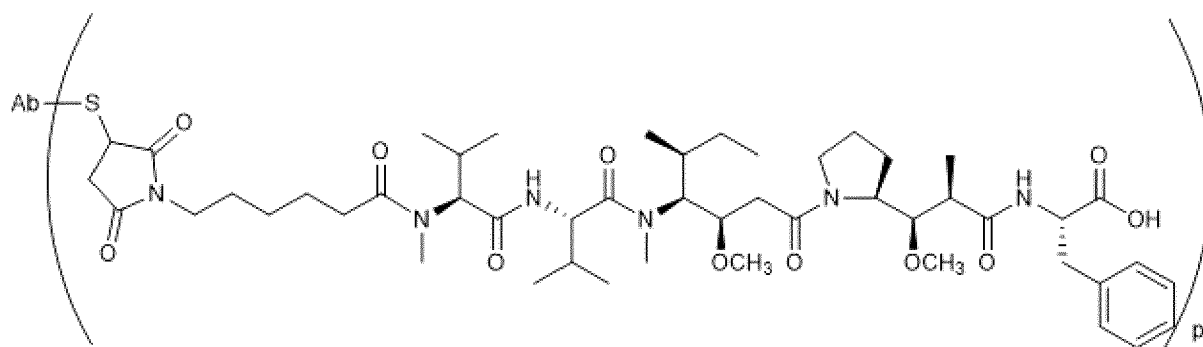
, val-cit (vc) представляет собой валин-цитруллиновый дипептид, PABC представляет собой *p*-аминобензилоксикарбонильную группу, и dLAE представляет собой трипептид D-лейцин-аланин-глутаминовая кислота:



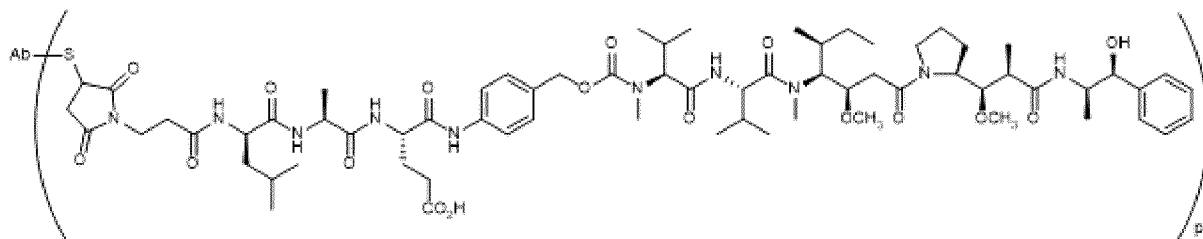
mc-vc-PABC-MMAE



mc-vc-PABC-MMAF



mc-MMAF



mp-dLAE-PABC-MMAE. В некоторых вариантах осуществления, нагрузка лекарственного средства представлена p , числом молекул лекарственного средства-линкер на антитело. В некоторых вариантах осуществления p может представлять собой среднее количество молекул лекарственное средство-линкер на одно антитело в композиции антител, также относящееся к средней нагрузке лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления p находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления p находится в диапазоне от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления, когда p представляет собой среднюю дозу лекарственного средства, p составляет от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления p составляет около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых вариантах осуществления среднее количество лекарственных средств на одно антитело в препарате может быть охарактеризовано с помощью обычных средств, таких как масс-спектропия, НИС, анализ ELISA и ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок (например, антитело) присоединен к линкеру лекарственного средства через остаток цистеина антитела. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина представляет собой тот, что встроен в антитело. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина представляет собой остаток цистеина межцепочечного дисульфида.

С. Примеры ADC

[00336] Неограничивающие примерные ADC для применения в данных способах включают ADC, содержащие антитело, которое связывает любую из иллюстративных мишеней, обсуждаемых в данном документе, конъюгированное с любым из разрушителей тубулина, описанных в данном документе.

[00337] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой ADC

антитело к сиалил-Tn-антигену, содержащее антитело, которое связывается с сиалил-Tn-антигеном (sTn) и MMAE. См., например, публикацию патента США № 2018/0327509A1; WO2017083582A1; Таблица последовательностей в данном документе.

[00338] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой белантамаб мафодотин, который содержит антитело, которое связывается с антигеном созревания В-клеток (BCMA) и MMAE. См., например, патент США № 9273141.

[00339] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой ADC к клаудину-18.2, содержащий ауристатин и следующее антитело:золбетуксимаб (175D10), раскрытое в патенте США № 8168427, и содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60 или содержащая CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 61-66; 163E12, раскрытое в патенте США № 8168427, и содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, или содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:69 -74;любое антитело к клаудину-18.2, раскрытое в публикации PCT № WO 2020/135674 A1; илилюбое антитело к клаудину-18.2, раскрытое в публикации PCT № WO 2021/032157 A1.

[00340] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-PDL1V, содержащий антитело к PD-L1, и MMAE, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:77-82.

[00341] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-ALPV, содержащий антитело к ALP, и MMAE, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:85-90.

[00342] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B7H4V, содержащий антитело к B7H4, и MMAE, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и

CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:93-98.

[00343] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой диситамаб ведотин, содержащий антитело к HER2 и MMAE, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

[00344] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой лифастузумаб ведотин, содержащий антитело к NaPi2B и MMAE, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

[00345] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой энфортумаб ведотин, который содержит антитело, связывающее нектин-4 и MMAE. См., например, патент США № 8637642; WO 2012/047724. В некоторых вариантах осуществления антитело энфортумаб ведотин содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:105-110.

[00346] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B6A, который содержит антитело, связывающееся с AVB6 и MMAE. В некоторых вариантах осуществления SGN-B6A содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело к AVB6, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:113-118. В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело к AVB6, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:120, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:121-126.

[00347] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой ADC с антителом к CD228, содержащее антитело, связывающее CD228 и MMAE. См., например, публикацию патента США № 2020/0246479A1; WO2020/163225A1. В некоторых вариантах

осуществления ADC представляет собой SGN-CD228A, содержащий антитело к CD228, и MMAE, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:127, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:128, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:129-134.

[00348] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-LIV1A (ладиратузумаб ведотин; LV), содержащий антитело к LIV-1, и MMAE, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:135 и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:136 или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 137-142; причем SGN-LIV1A содержит антитело к LIV-1, конъюгированное с mc-vc-PABC-MMAE, mc-vc-PABC-MMAF, mc-MMAF или mp-dLAE-PABC-MMAE.

[00349] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой тизотумаб ведотин (TV), который содержит антитело, связывающее тканевой фактор (TF) и MMAE. См., например, патенты США № 9168314 и 9150658; WO 2011/157741; WO 2010/066803. В некоторых вариантах осуществления антитело TV содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:143, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144, или содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:145-150.

[00350] В некоторых вариантах осуществления ADC содержит MMAE и связывает мишень, выбранную из AMHRII, Ax1, CA9, CD142, CD20, CD22, CD228, CD248, CD30, CD33, CD7, CD48, CD71, CD79b, CLDN18.2, CLDN6, c-MET, EGFR, EphA2, ETBR, FCRH5, GCC, Globo H, gpNMB, HER-2, IL7R, интегрин бета -6, KAAG-1, LGR5, LIV-1, LRRC15, Ly6E, мезотелина (MSLN), MET, MRC2, MUC16, NaPi2b, нектин-4, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), PSMA, ROR1, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, STEAP-1, STn, TIM-1, TRA-1-60, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72).

[00351] В некоторых вариантах осуществления ADC содержит MMAE и является одним из: DP303c, также известного как SYSA1501, нацеленного на HER-2 (CSPC Pharmaceutical; Dophen Biomed), SIA01-ADC, также известного как ST1, нацеленного на STn (Siamab Therapeutics), ладиратузумаба ведотина, также известного как SGN-LIV1A, нацеленного на LIV-1 (Merck & Co., Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ABBV-085, также известного как самротамаб ведотин, нацеленного на LRRC15 (Abbvie; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), DMOT4039A, также известного как RG7600; α MSLN-MMAE, нацеленного на мезотелин (MSLN) (Roche-Genentech), RC68, также известного как Remegen EGFR ADC,

нацеленного на EGFR (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.)), RC108, также известного как RC108-ADC, нацеленного на c-MET (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.)), CMG901, также известного как MRG005, нацеленного на CLDN18.2 (Keymed Biosciences; Lepu biotech; Shanghai Miracogen Inc. (Shanghai Meiya Biotechnology Co., Ltd)), YBL-001, также известного как LCB67, нацеленного на DLK-1 (Lego Chem Biosciences; Pyxis Oncology; Y-Biologics), DCDS0780A, также известного как иладатузумаб ведотин; RG7986, нацеленного на CD79b (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), тизотумаба ведотина, также известного как Humax-TF-ADC; tf-011-mmae; TIVDAK™, нацеленного на CD142 (GenMab; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), GO-3D1-ADC, также известного как humAb-3D1-MMAE ADC, нацеленного на MUC1-C (Genus Oncology LLC), ALT-P7, также известного как HM2-MMAE, нацеленного на HER-2 (Alteogen, Inc.; Levena Biopharma; 3SBio, Inc.), вандортузумаба ведотина, также известного как DSTP3086S; RG7450, нацеленного на STEAP-1 (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), лифастузумаба ведотина, также известного как DNIB0600A; NaPi2b ADC; RG7599, нацеленного на NaPi2b (Roche-Genentech), софитузумаба ведотина, также известного как DMUC5754A; RG7458, нацеленного на MUC16 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Roche-Genentech), RG7841, также известного как DLYE5953A, нацеленного на Ly6E (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), RG7598, также известного как DFRF4539A, нацеленного на FCRH5 (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), RG7636, также известного как DEDN6526A, нацеленного на ETBR (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Roche-Genentech), пинатузумаба ведотина, также известного как DCDT2980S; RG7593, нацеленного на CD22 (Roche-Genentech), полатузумаба ведотина, также известного как DCDS4501A; POLIVY™; RG7596; RO-5541077, нацеленного на CD79b (Chugai Pharmaceutical; Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), DMUC4064A, также известного как D-4064a; RG7882, нацеленного на MUC16 (Roche-Genentech; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), SYSA1801, также известного как CPO102, нацеленного на CLDN18.2 (Conjupro Biotherapeutics Inc.; CSPC ZhongQi Pharmaceutical Technology Co.), RC118, также известного как Claudin18.2- ADC; YH005, нацеленного на CLDN18.2 (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.); Biocytogen), VLS-101, также известного как цирмтузумаб ведотин; МК-2140; UC-961ADC3; зиловертамаба ведотина, нацеленного на ROR1 (VelosBio. Inc), глембатумумаба ведотина, также известного как CDX-011; CR011-vcMMAE, нацеленного на gpNMB (Celldex Therapeutics), BA3021, также известного как САВ-ROR2-ADC; озурифтамаба ведотина, нацеленного на ROR2 (Bioatla; Himalaya Therapeutics), BA3011, также известного как САВ-AXL-ADC; мекботамаба ведотина, нацеленного на Axl (Bioatla; Himalaya Therapeutics), CM-09, также известного как бстронгксимаб-ADC, нацеленного на TRA-1-60 (CureMeta), ABBV-838, также известного как азинтуксизумаб ведотин, нацеленного на SLAMF7 (Abbvie), энапотумаба ведотина, также известного как AXL-107-MMAE; HuMax-AXL-ADC, нацеленного на Axl (GenMab; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ARC-01, также известного как анти-CD79b ADC, нацеленного на CD79b (Araris Biotech AG), дизитамаба ведотина, также известного как Aidexi®; RC48,

нацеленного на HER-2 (RemeGen (Rongchang Biopharmaceutical (Yantai) Co., Ltd.); Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ASG-5ME, также известного как AGS-5; AGS-5ME, нацеленного на SLC44A4 (Agensys, Inc.; Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), энфортумаба ведотина, также известного как AGS-22M6E; ASG-22CE; ASG-22ME; PADCEV™, нацеленного на Nectin-4 (Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), ASG-15ME, также известного как AGS-15E; сиртратумаба ведотина, нацеленного на SLITRK6 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Astellas Pharma Inc.), брентуксимаба ведотина, также известного как адсетрис; сAC10-vcMMAE; SGN-35, нацеленного на CD30 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.; Takeda), телизотумаба ведотина, также известного как ABBV-399, нацеленного на с-MET (Abbvie), лосатуксизумаба ведотина, также известного как ABBV-221, нацеленного на EGFR (Abbvie), CX-2029, также известного как ABBV-2029, нацеленного на CD71 (Abbvie; CytomX Therapeutics), AB-3A4-ADC, также известного как AB-3A4-vcMMAE, нацеленного на КААG-1 (Alethia Biotherapeutics), индулатумаба ведотина, также известного как 5F9-vcMMAE; MLN0264; TAK-264, нацеленного на GCC (Takeda; Millennium Pharmaceuticals, Inc), FOR46 нацеленного на CD46 (Fortis Therapeutics, Inc.), LR004-VC-MMAE нацеленного на EGFR (Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College Hospital), CD30-ADC нацеленных на CD30 (NBE Therapeutics; Boehringer Ingelheim), антиэндосиалина-МС-VC-PABC-MMAE нацеленного на CD248 (Genzyme), OBI-998 нацеленного на SSEA-4 (OBI Pharma), MRG002 нацеленного на HER-2 (Lepu biotech; Shanghai Miracogen Inc. (Shanghai Meiya Biotechnology Co., Ltd)), TRS005 нацеленного на CD20 (Teruisi Pharmaceuticals), Oba01 нацеленного на DR5 (рецептор смерти 5) (Obio Technology (Shanghai) Corp.,Ltd.; Yantai Obioadc Biomedical Technology Ltd.), PSMA ADC нацеленного на PSMA (Progenics Pharmaceuticals, Inc; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), SGN-CD48A нацеленного на CD48 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), IMAB362-vcMMAE нацеленного на CLDN18.2 (Astellas Pharma Inc.; Ganymed), GB251 нацеленного на HER-2 (Genor Biopharma Co., Ltd.), Innate Pharma BTG-ADC нацеленных на CD30 (Innate Pharma; Sanofi), ADCendo uPARAP ADC нацеленного на MRC2 (ADCendo), XCN-010 нацеленного на actM (Xiconic Pharmaceuticals, LLC), ANT-043 нацеленного на HER-2 (Antikor Biopharma), OBI-999 нацеленного на Globo H (Abzena; OBI Pharma), LY3343544 нацеленного на MET (Eli Lilly and Company), анти-TAG72 ADC Tagworks нацеленного на TAG-72 (Tagworks Pharmaceuticals), IMAB027-vcMMAE нацеленного на CLDN6 (Ganymed; Astellas Pharma Inc.), LGR5-ADC нацеленного на LGR5 (Genentech, Inc.), Philochem B12-MMAE ADC нацеленного на IL-7R (Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes; Philochem AG), TE-1522 нацеленного на CD19 (Immunwork), SGN-STNV нацеленного на STn (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), HTI-1511 нацеленного на EGFR (Abzena; Halozyme Therapeutics), Pepton PAb001-ADC нацеленного на OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1) (Pepton; Qilu Pharmaceutical co. Ltd.), LM-102 нацеленного на CLDN18.2 (LaNova Medicines Limited), Anwita Biosciences MSLN-MMAE нацеленного на мезотелин (MSLN) (Anwita biosciences), SGN-CD228A нацеленного на CD228 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), NBT828 нацеленного на HER-2 (NewBio Therapeutics; Genor Biopharma Co., Ltd.), Gamamabs GM103

нацеленного на AMHR2 (GamaMabs Pharma; Exelixis), LCB14-0302 нацеленного на HER-2 (Lego Chem Biosciences), BAY79-4620 нацеленного на карбоангидразу IX (CAIX) (Bayer; MorphoSys), NBT508 нацеленного на CD79b (NewBio Therapeutics), PAT-DX3-MMAE нацеленного на Undisclosed (Patrys; Yale University), AGS67E нацеленного на CD37 (Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), CDX-014 нацеленного на TIM-1 (Celldex Therapeutics), BVX001 нацеленного на CD33; CD7 (Bivictrix therapeutics), SGN-B6A нацеленного на интегрин бета-6 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), MRG003 нацеленного на EGFR (Lepu biotech; Shanghai Miracogen Inc. (Shanghai Meiya Biotechnology Co., Ltd)) и PYX-202 нацеленного на DLK-1 (Pyxis Oncology; Lego Chem Biosciences).

[00352] В некоторых вариантах осуществления ADC содержит MMAF и связывает мишень, выбранную из BCMA, GPC-1, CD30, с-MET, SAIL, HER-3, CD70, CD46, HER-2, 5T4, ENPP3, CD19, EGFR, EphA2.

[00353] В некоторых вариантах осуществления ADC содержит MMAF и является одним из: CD70-ADC нацеленного на CD70 (Kochi University; Osaka University), IGN786 нацеленного на SAIL (AstraZeneca; Igenica Biotherapeutics), PF-06263507 нацеленного на 5T4 (Pfizer), GPC1-ADC нацеленного на GPC-1 (Kochi University), ADC-AVP10 нацеленного на CD30 (Aviper), M290-MC-MMAF нацеленного на CD103 (The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University), BVX001 нацеленного на CD33; CD7 (Bivictrix therapeutics), Tanabe P3D12-vc-MMAF нацеленного на с-MET (Tanabe Research Laboratories), LILRB4-Targeting ADC нацеленного на LILRB4 (The University of Texas Health Science Center, Houston), TSD101, также известного как ABL201, нацеленного на BCMA (TSD Life Science; ABL Bio; Lego Chem Biosciences), депатуксизумаба мафодотина, также известного как ABT-414, нацеленного на EGFR (Abbvie; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), AGS16F, также известного как AGS-16C3F; AGS-16M8F, нацеленного на ENPP3 (Astellas Pharma Inc.; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), AVG-A11 BCMA ADC, также известного как AVG-A11-mcMMAF, нацеленного на BCMA (Avantgen), белантамаба мафодотина, также известного как BLENREP; GSK2857916; J6M0-mcMMAF, нацеленного на BCMA (GlaxoSmithKline; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), MP-HER3-ADC, также известного как HER3-ADC, нацеленного на HER-3 (MediaPharma), FS-1502, также известного как LCB14-0110, нацеленного на HER-2 (Lego Chem Biosciences; Shanghai Fosun Pharmaceutical Development Co, Ltd.), MEDI-547, также известного как MI-CP177, нацеленного на EphA2 (AstraZeneca; Seagen (Seattle Genetics) Inc.), форсетузимаба мафодотина, также известного как SGN-75, нацеленного на CD70 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.), денинтузимаба мафодотина, также известного как SGN-CD19A, нацеленного на CD19 (Seagen (Seattle Genetics) Inc.) и HTI-1066, также известного как SHR-A1403, нацеленного на с-MET (Jiangsu HengRui Medicine Co., Ltd).

[00354] В некоторых вариантах осуществления ADC выбирают из ADC в таблице А, таблице В или таблице С. В таблице А, таблице В и таблице С ADC с последовательностями, представленными в таблице последовательностей, отмечены звездочкой (*). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой не

энфортумаб ведотин. В определенных вариантах осуществления ADC представляет собой не брентуксимаб ведотин. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой не тизотумаб ведотин. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой не ладиратузумаб ведотин. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой не SGN-CD228A.

Таблица А

Патент	Название лекарственного средства	Мишень	Фрагмент	Линкер	Полезная нагрузка
US 8545850	Полатузумаб ведотин	CD79b	Изотип полатузумаба: IgG1-происхождение: Гуманизированный	Валин-Цитруллин	ММАЕ
	Гемтузумаб озогомицин	CD33	Изотип гемтузумаба: IgG4-происхождение: Гуманизированный	ацилгидразон-дисульфид AcBut	Калихемицин
US 9273141	Белантамаб мафодотин	BCMA	Изотип белантамаба (J6M0): IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAb	mc	ММАF
US 9808537	Трастузумаб дерукстекал	HER-2	Изотип трастузумаба: IgG1-происхождение: Гуманизированный	GGFG (Глицин-глицин-фенилаланин-глицин)	DXd/DX8951 (MAAA-1181a)
US 8637642 (WO 2012/047724)	Энфортумаб ведотин*	нектин-4	Изотип энфортумаба: IgG1k-происхождение: человек	Валин-Цитруллин	ММАЕ
US 8153768	Инотузумаб озогомицин	CD22	Изотип инотузумаба: IgG4-происхождение: Гуманизированный	ацилгидразон-дисульфид AcBut	Калихемицин
WO 2004/010957	Брентуксимаб ведотин (SGN-35)*	CD30	Изотип брентуксимаба: IgG1-происхождение: химерный	Валин-Цитруллин	ММАЕ
US 7517964; US 8877901	Сацитузумаб говитекал	TROP-2	Изотип сацитузумаба (hRS7): IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAb	CL2A	SN-38
US 8337856	Трастузумаб эмтанзин	HER-2	Изотип трастузумаба: IgG1-происхождение: Гуманизированный	SMCC	DM1

Таблица В

Название лекарственного средства	Другие названия лекарственного средства	Мишень	Фрагмент	Линкер	Полезная нагрузка
CX-2029	ABBV-2029	CD71	Протело	Валин-Цитруллин	ММАЕ
DP303c		HER-2		Неизвестно	ММАЕ
HTI-1066	SHR-A1403	c-MET	Изотип анти-C-MET: IgG2-происхождение: гуманизированный формат: mAB	3-пропилтио-мс	ММАF
FOR46		CD46	Изотип 23AG2: IgG1-происхождение: человеческий формат: Другое mAB: гуманизированное анти-CD46	Валин-Цитруллин	ММАF
AGS62P1	ASP1235	FLT3	Моноклональное антитело к FLT3 Изотип: IgG1 Происхождение: Человек	Оксим	AGD-0182
BT8009		нектин-4		Валин-Цитруллин	ММАЕ
ARX788		HER-2		Оксим	Amberstatin269
XMT-1536		NaPi2b	Изотип XMT-1535: IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAB	Полимер флексимера	Ауристин F-HPA
ALT-P7	HM2-MMAE	HER-2	Изотип трастузумаба: IgG1 Происхождение: гуманизированный формат: mAB Другое: вариант трастузумаба NexMab	Валин-Цитруллин	ММАЕ
FS-1502	LCB14-0110	HER-2	Трастузумаб	линкер β - глюкуронидазы (BG)	ММАF

Кофетузумаб пелидотин	PF-06647020, PTK7-ADC, PF- 7020, ABBV-647	PTK7	Изотип h6M24: IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAB	Валин-Цитруллин	PF-06380101
TRS005		CD20	Изотип ритуксимаба: IgG1-происхождение: Химерный Формат: mAb	Валин-Цитруллин	ММАЕ
STI-6129	ADC CD38, LNDS1001, ADC CD38-077	CD38	Изотип STI-5171: IgG1-происхождение: человеческий формат: mAB	Неизвестно	Дуостатин 5.2
Тизотумаб ведотин*	Humax-TF-ADC, tf-011-mmae	CD142	HuMab (антитело HuMax) Изотип: IgG1 Происхождение: человек	Валин-Цитруллин	ММАЕ
Цирмтузумаб ведотин	VLS-101, UC- 961ADC3	ROR1	Изотип цирмтузумаба (UC-961): IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAB	Расщепляемый протеазой	ММАЕ
AbGn-107	Ab1-18Hr1	AG-7	Изотип AbGn-7: IgG1-происхождение: Гуманизированный формат: mAB	Валин-Цитруллин	MMAD
ASN-004		5T4	Нераскрытый формат: антитело scFvFc	Полимер флексимера	Доластатин
SGN-B6A*		Интегрин бета-6	Происхождение h2A2: гуманизированный	Валин-Цитруллин	ММАЕ
Дизитамаб ведотин*	RC48	HER-2	Изотип гертузумаба: IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAB	Валин-Цитруллин	ММАЕ
Телизотузумаб ведотин	ABBV-399	c-MET	ABT-700	Валин-Цитруллин	ММАЕ

Энапотамаб ведотин	HuMax-AXL- ADC, AXL-107- MMAE	Axl	Происхождение антитела HuMax: Человеческий Формат: Полная длина	Валин-Цитруллин	MMAE
OBI-999		Globo H	Изотип OBI-888: IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAb	Дисульфид	MMAE
XMT-1592		NaPi2b	Неизвестно	Неизвестно	Ауристин F-HPA
SGN-CD228A		CD228	hL49 (моноклональное антитело к CD228A) Происхождение: Гуманизированный Формат: mAb	линкер β - глюкуронидазы (BG)	MMAE
Ладиратузумаб ведотин *	SGN-LIV1A	LIV-1	Изотип ладиратузумаба (hLIV-22): IgG1-происхождение: гуманизированный формат: mAb	Валин-Цитруллин	MMAE
BT5528		EphA2	Неизвестно	Валин-Цитруллин	MMAE
PF-06804103	ADC NG-HER2	HER-2	Неизвестный изотип: IgG1-происхождение: человек	Валин-Цитруллин	PF-06380101 (Aur 101)
W0101		IGF-1R	hz208F2-4 (антитело к IGF1R) Происхождение: Гуманизированный Формат: mAb	mc	Ауристин
BA3011	CAB-AXL-ADC	Axl	Другой CAB-Axl: Условно активные биологические препараты (CAB) антитела к Axl	Неизвестно	MMAE
MRG002		HER-2	Изотип к HER2: IgG1-происхождение: Гуманизированный Формат: mAb	Неизвестно	MMAE
ZW49		HER- 2,HER-2	Изотип ZW25: формат IgG1: биспецифический, изотип ZW25: формат IgG1: биспецифический	Валин-Цитруллин	Ауристин

Таблица С

Патент	Названия ADC	мишени:
US 9168314(WO 2011/157741)	Тизотумаб ведотин (TV)*	CD142 (тканевой фактор)
US 9273141	Белантамаб мафодотин	BCMA
US 8637642(WO 2012/047724)	Энфортумаб ведотин (EV)*	нектин-4
US 11028181 (WO2017083582A1); см. Таблицу последовательностей в данном документе	SGN-STNV	STN
	Энапотумаб ведотин	Ax1
US 2020/0246479 (WO 2020/163225; VH/VL SEQ ID NO:7 и 8, соответственно (CDR SEQ ID NO: 1-6)); см. Таблицу последовательностей в данном документе	SGN-CD228A*	CD228
US 2021/0198367 (заявляет приоритет USSN 62/943959 и USSN 62/012584); См. Таблицу последовательностей в данном документе	SGN-B6A*	Интегрин бета-6
WO 2012/078688	Ладиратузумаб ведотин (LV)*	LIV-1
WO 2004/010957	Брентуксимаб ведотин (SGN-35)*	CD30
US 8329173	Телизотузумаб ведотин	c-MET
US 8545850	Полатузумаб ведотин	CD79b
US 7662387	Форсетузумаб мафодотин	CD70

D. Получение антител

[00355] Для получения антитела можно использовать многие методики, известные в данной области техники. См., например, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); and Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed. 1986)).

[00356] Гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи интересующего антитела, можно клонировать из клетки, например, гены, кодирующие моноклональное антитело, можно клонировать из гибридомы, которая экспрессирует антитело, и использовать для получения рекомбинантного моноклонального антитела. Библиотеки генов, кодирующие тяжелые и легкие цепи моноклональных антител, также могут быть получены из гибридомных или плазматических клеток. Кроме того, технологию фагового или дрожжевого дисплея можно использовать для идентификации антител и гетеромерных Fab-фрагментов, которые специфически связываются с выбранными антигенами (см., например, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992); Lou *et al.* (2010) *PEDS* 23:311 и Chao *et al.*, *Nature Protocols*, 1:755-768 (2006)). Альтернативно, антитела и последовательности антител могут быть выделены и/или идентифицированы с использованием системы презентации антител на основе дрожжей, такой как описанная, например, в Xu *et al.*, *Protein Eng Des Sel*, 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256 и WO 2012/009568. Случайные комбинации продуктов генов тяжелой и легкой цепей создают большой пул антител с различной антигенной специфичностью (см., например, Kubu, *Immunology* (3rd ed. 1997)). Методы получения одноцепочечных антител или рекомбинантных антител (патент США № 4946778, патент США № 4816567) также могут быть адаптированы для получения антител. Антитела также можно сделать биспецифическими, то есть способными распознавать два разных антигена (см., например, WO 93/08829, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) и Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Антитела также могут быть гетероконъюгатами, например, два ковалентно соединенных антитела или антитела, ковалентно связанные с иммунотоксинами (см., например, патент США № 4676980, WO 91/00360 и WO 92/200373).

[00357] Антитела могут быть получены с использованием любого количества систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой клетку млекопитающего, такую как гибридома, или клетка СНО. Многие такие системы широко доступны у коммерческих поставщиков. В вариантах осуществления, в которых антитело содержит как тяжелую цепь, так и легкую цепь, тяжелая цепь, тяжелая цепь и легкая цепь могут экспрессироваться с использованием одного вектора, например, в дицистронной единице экспрессии, или находиться под контролем разных промоторов. В других вариантах осуществления области тяжелой цепи и легкой цепи могут быть экспрессированы с использованием отдельных векторов. Тяжелые цепи и легкие цепи, как

описано в данном документе, могут необязательно содержать метионин на N-конце.

[00358] В некоторых вариантах осуществления генерируются фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, scFv или диатело). Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117 (1992) и Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Однако теперь эти фрагменты могут быть получены непосредственно с использованием рекомбинантных клеток-хозяев. Например, фрагменты антител можно выделить из фаговых библиотек антител. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменты могут быть выделены непосредственно из клеток *E. coli* и химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (см., например, Carter *et al.*, *BioTechnology*, 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны специалистам в данной области. В других вариантах осуществления антитело выбора представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См., например, публикацию РСТ № WO 93/16185; и патенты США № 5571894 и 5587458. Фрагмент антитела также может представлять собой линейное антитело, как описано, например, в патенте США № 5641870.

[00359] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела могут быть конъюгированы с другой молекулой, например, полиэтиленгликолем (ПЭГиление) или сывороточным альбумином, для увеличения периода полувыведения *in vivo*. Примеры пегилирования фрагментов антител приведены в Knight *et al. Platelets* 15:409, 2004 (для абциксимаба); Pedley *et al.*, *Br. J. Cancer* 70:1126, 1994 (для антитела к СЕА); Chapman *et al.*, *Nature Biotech.* 17:780, 1999 и Humphreys, *et al.*, *Protein Eng. Des.* 20: 227, 2007).

[00360] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены мультиспецифические антитела, например биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными антигенами или по меньшей мере с двумя разными эпитопами одного и того же антигена. Способы получения мультиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелой цепи и легкой цепи в клетке-хозяине (см., например, Zuo *et al.*, *Protein Eng Des Sel*, 2000, 13:361-367); модификации «выступ во впадину» (см., например, Ridgway *et al.*, *Protein Eng Des Sel*, 1996, 9:617-721); технологию «диатело» (см., например, Hollinger *et al.*, *PNAS (USA)*, 1993, 90:6444-6448) и внутримолекулярную тримеризацию (см., например, Alvarez-Cienfuegos *et al.*, *Scientific Reports*, 2016, doi:/10.1038/srep28643); см. также, Spiess *et al.*, *Molecular Immunology*, 2015, 67(2), Part A:95-106.

Выбор константной области

[00361] Варибельные области тяжелой и легкой цепей описанных в данном документе антител могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области

человека. Выбор константной области частично зависит от того, желательны ли антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изоотипы IgG1 и IgG3 человека обладают сильной комплементзависимой цитотоксичностью, изотип IgG2 человека обладает слабой комплементзависимой цитотоксичностью, а IgG4 человека не обладает комплементзависимой цитотоксичностью. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные области легкой цепи могут представлять собой лямбда или каппа. Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепи связаны через спейсер.

[00362] Константные области человека демонстрируют аллотипические вариации и изоаллотипические вариации между разными людьми, то есть константные области могут различаться у разных людей в одном или более полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью одного или более других изотипов.

[00363] Одна или более аминокислот на амино- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или быть дериватизированы в пропорции или во всех молекулах. Замены могут быть сделаны в константных областях для снижения или усиления эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или ADCC (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для продления периода полувыведения у людей (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

[00364] Для конструирования желаемых конъюгатов антитело-лекарственное средство в некоторых вариантах осуществления иллюстративная замена включает аминокислотную замену нативной аминокислоты на остаток цистеина, введенный в аминокислотное положение 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутацию S239C в изотипе IgG1 человека (нумерация соответствует индексу EU (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991); см. US 20100158909, который включен в данный документ посредством ссылки). Присутствие дополнительного остатка цистеина может способствовать образованию межцепочечной дисульфидной связи. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызывать стерические затруднения, тем самым снижая аффинность связывающего взаимодействия Fc-область-FcγR. Остатки цистеина, введенные в область Fc константной области IgG или вблизи нее, также могут служить сайтами для конъюгации с терапевтическими агентами (т.е. связывание цитотоксических препаратов с использованием специфических тиоловых реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств. Присутствие терапевтического агента вызывает

стерические затруднения, тем самым дополнительно снижая аффинность связывающего взаимодействия Fc-область-Fc γ R. Другие замены в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 снижают аффинность к рецепторам Fc γ , особенно к рецептору Fc γ RI (см., например, , US 6624821, US 5624821.)

[00365] Период полужизни антитела *in vivo* также может влиять на его эффекторные функции. Период полужизни антитела может быть увеличен или уменьшен для изменения его терапевтической активности. FcRn представляет собой рецептор, структурно сходный с антигеном МНС класса I, который нековалентно связывается с β 2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз в тканях (Ghetie and Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6,0 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет возвращать IgG обратно в кровоток (Ghetie and Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Была картирована область IgG1 человека, участвующая в связывании FcRn (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Замены на аланин в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 человеческого IgG1 усиливают связывание FcRn (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Молекулы IgG1, несущие эти замены, имеют более длительный период полужизни в сыворотке. Следовательно, эти модифицированные молекулы IgG1 могут выполнять свои эффекторные функции и, следовательно, проявлять свою терапевтическую эффективность в течение более длительного периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие иллюстративные замены для усиления связывания с FcRn включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428. Нумерация EU используется для всех позиций в константной области.

[00366] Активность связывания комплемента антител (как связывание C1q, так и активность CDC) может быть улучшена заменой Lys326 и Glu333 (Idusogie *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-2575). Те же самые замены в скелете IgG2 человека могут преобразовать изотип антитела, который плохо связывается с C1q и имеет серьезный дефицит активности активации комплемента, в изотип, который может одновременно связывать C1q и опосредовать CDC (Idusogie *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-75). Несколько других методов также применялись для улучшения связывающей комплемент активности антител. Например, прививка 18-аминокислотного карбоксиконцевого хвостового фрагмента IgM к карбоксиконцу IgG значительно усиливает их CDC-активность. Это наблюдается даже с IgG4, который в норме не имеет обнаруживаемой CDC-активности (Smith *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:2226-36). Кроме того, замена Ser444, расположенного вблизи карбоксиконца тяжелой цепи IgG1, на Cys индуцировала димеризацию IgG1 «хвост к хвосту» с 200-кратным увеличением активности CDC по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22). Кроме того, биспецифическая конструкция диатела со специфичностью в отношении C1q также придает активность CDC (Kontermann *et al.*, 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

[00367] Активность комплемента может быть снижена путем мутации по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи на остаток с другой боковой цепью, такой как Ala. Другие алкилзамещенные неионогенные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Tyr, Trp и Pro вместо любого из трех остатков, также уменьшают или устраняют связывание C1q. Ser, Thr, Cys и Met можно использовать в остатках 320 и 322, но не 318, для снижения или отмены активности связывания C1q. Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может изменить, но не отменить активность связывания C1q. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к исчезновению литической активности, но лишь незначительно снижает (примерно в три раза) аффинность к C1q. Это изменение разрушает сайт гликозилирования и присутствие углеводов, необходимых для активации комплемента. Любая другая замена в этом сайте также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также снижают связывание C1q: D270A, K322A, P329A и P311S (см. WO 06/036291).

[00368] Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую перестановку остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах. Кроме того, может присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций относительно естественной константной области человека, таких как указанные выше, для уменьшения связывания с рецептором Fcγ или увеличения связывания с FcRN.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

[00369] В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, получают с использованием рекомбинантных способов. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител, описанных в данном документе (например, любой один или более CDR, описанных в данном документе); векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты; и клетки-хозяева, в которые вводят нуклеиновые кислоты, используемые для репликации нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, и/или для экспрессии антител. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO); или клеткой человека.

[00370] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей (например, CDR, тяжелой цепи, легкой цепи и/или каркасных областей), раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей

мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности) идентичную последовательности (например, последовательности CDR, тяжелой цепи, легкой цепи или каркасной области) раскрытой в данном документе.

[00371] В еще одном аспекте предложены способы получения антитела, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе (например, клетки-хозяина, экспрессирующей полинуклеотид или вектор, как описано в данном документе), в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

[00372] Подходящие векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела по данному изобретению, или их фрагменты, включают векторы клонирования и векторы экспрессии. Хотя выбранный клонирующий вектор может варьировать в зависимости от клетки-хозяина, которую предполагается использовать, полезные клонирующие векторы обычно обладают способностью к саморепликации, могут иметь единственную мишень для конкретной эндонуклеазы рестрикции и/или могут нести гены маркера, который можно использовать при отборе клонов, содержащих вектор. Примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Клонирование векторы доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene и Invitrogen.

[00373] Векторы экспрессии обычно представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по данному изобретению. Вектор экспрессии может реплицироваться в клетках-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и любые другие векторы.

Экспрессия рекомбинантных антител

[00374] Антитела обычно получают путем рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антител, включая природные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. После включения вектора в соответствующего хозяина этот хозяин поддерживается в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, а также для сбора и очистки перекрестно реагирующих антител.

[00375] Клетки млекопитающих являются предпочтительным хозяином для

экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают клеточные линии CHO (например, DG44), различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки не являются человеческими. Векторы экспрессии для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и сайты необходимой обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[00376] После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами в данной области техники, включая очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (см. в целом, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Характеристика антител

[00377] Методы анализа аффинности связывания, кинетики связывания и перекрестной реактивности известны в данной области. См., например, Ernst et al., *Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley & Sons ed. 2009). Эти методы включают, но не ограничиваются ими, твердофазные анализы связывания (например, анализ ELISA), иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс (SPR, например, Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), анализы кинетического исключения (например, KinExA ®), проточную цитометрию, сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), интерферометрию BioLayer (например, Octet™ (FortéBio, Inc., Менло-Парк, Калифорния)) и анализ вестерн-блот. Методы SPR раскрыты, например, в Hahnfeld et al. *Determination of Kinetic Data Using SPR Biosensors, Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (2004). В типичном эксперименте SPR одно взаимодействующее вещество (мишень или нацеливающий агент) иммобилизуется на SPR-активном предметном стекле с золотым покрытием в проточной ячейке, а образец, содержащий другое взаимодействующее вещество, вводят для протекания по поверхности. Когда на поверхность светит свет с заданной длиной волны, изменения оптической отражательной способности золота указывают на связывание и кинетику связывания. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности используют анализы кинетического исключения. Эта методика описана, например, в Darling et al., *Assay and Drug Development Technologies* Vol. 2, number 6 647-657 (2004). В некоторых вариантах осуществления интерферометрические анализы BioLayer используются для определения аффинности. Эта методика описана, например, в Wilson et al., *Biochemistry and Molecular*

Biology Education, 38:400-407 (2010); Dysinger et al., *J. Immunol. Methods*, 379:30-41 (2012).

IV. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

[00378] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы лечения рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту (1) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), который содержит первое антитело, связывающее опухолеассоциированный антиген, и цитотоксический агент, при этом цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина; и (2) второе антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, при этом второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR. В некоторых вариантах осуществления Fc второго антитела имеет усиленное связывание с одним или более из FcγRIIIa, FcγRIIIa и/или FcγRI. В некоторых вариантах осуществления Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR. В некоторых вариантах осуществления Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIIb.

[00379] В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение субъекту с раком (1) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), причем ADC содержит первое антитело, которое связывает опухолеассоциированный антиген, и цитотоксический агент, причем цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина и (2) второе антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, при этом второе антитело содержит Fc с усиленной активностью ADCC по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа. В некоторых вариантах осуществления второе антитело содержит Fc с усиленной активностью ADCC и ADCP по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа. В некоторых вариантах осуществления Fc второго антитела имеет усиленное связывание с одним или более из FcγRIIIa, FcγRIIIa и/или FcγRI. В некоторых вариантах осуществления Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR. В некоторых вариантах осуществления Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIIb.

[00380] В различных вариантах осуществления второе антитело представляет собой нефукозилированное антитело. В различных таких вариантах осуществления второе антитело содержится в композиции антител, где по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител в композиции являются нефукозилированными.

[00381] В некоторых вариантах осуществления второе антитело связывает TIGIT. В некоторых вариантах осуществления второе антитело связывает CD40. В некоторых вариантах осуществления второе антитело связывает активатор иммунных клеток, представленный в данном документе.

[00382] В различных вариантах осуществления разрушителем тубулина, конъюгированным с первым антителом в ADC, является ауристатин, тубулизин, колхицин, алкалоид барвинка, таксан, криптофицин, майтансиноид или гемиастерлин. В некоторых

вариантах осуществления ADC содержит MMAE или MMAF. В различных вариантах осуществления первое антитело связывает опухолеассоциированный антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, предложенный в данном документе.

[00383] Любой из ADC, описанных в данном документе, можно комбинировать с любым из антител, которые связывают активатор иммунных клеток, описанный в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-PDL1V, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-ALPV, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B7H4V, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой лифастузумаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SEA-CD40, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SEA-CD70, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B6A, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-CD228A, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-LIV1A, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-STNV, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой брентуксимаб ведотин (SGN-35), а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой энфортумаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой диситамаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой тизотумаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-BCMA.

[00384] В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-PDL1V, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-ALPV, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B7H4V, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой лифастузумаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SEA-CD40, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SEA-CD40, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SEA-CD70, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B6A, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-CD228A, а второе антитело представляет собой SEA-CD40. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-LIV1A, а второе антитело

некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-B6A, а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-CD228A, а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-LIV1A, а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой SGN-STNV, а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой брентуксимаб ведотин (SGN-35), а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой энфортумаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой диситамаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-TGT. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой тизотумаб ведотин, а второе антитело представляет собой SEA-TGT.

[00387] В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[00388] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, рак шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, светлоклеточный рак почки, рак головы и шеи, рак легких, аденокарциному легких, рак желудка, рак из зародышевых клеток, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, меланому, новообразование центральной нервной системы, мезотелиому, лимфому, лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, миелому или саркому. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака желудка, рака яичка, рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, рака предстательной железы, рака молочной железы, мезотелиомы и светлоклеточной почечной карциномы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому или лейкоз, включая, помимо прочего, острый миелоидный, хронический миелоидный, острый лимфоцитарный или хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому из мантийных клеток, малую лимфоцитарную лимфому, первичную В-крупноклеточную лимфому средостения, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки или В-клеточную лимфому экстранодальной маргинальной зоны. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из хронического лимфоцитарного лейкоза, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и лимфомы Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак.

[00389] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак с высокой мутационной нагрузкой, поскольку такие виды рака содержат больше антигена для управления ответами Т-клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак с высокой мутационной нагрузкой, такой как рак легкого,

меланома, мочевой пузырь или рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак имеет микросателлитную нестабильность.

[00390] В различных вариантах осуществления второе антитело истощает T-регуляторные (Treg) клетки, активирует антигенпрезентирующие клетки (APC), усиливает ответы T-клеток CD8, активирует костимулирующие рецепторы и/или способствует высвобождению иммуноактивирующих цитокинов (таких как CXCL10 и/или IFN γ). В некоторых вариантах осуществления второе антитело способствует высвобождению иммуноактивирующих цитокинов в большей степени, чем иммуносупрессивных цитокинов (таких как IL10 и/или MDC).

[00391] ADC и второе антитело можно вводить одновременно или последовательно. При последовательном введении первую дозу ADC можно вводить перед первой дозой второго антитела, или первую дозу второго антитела можно вводить перед ADC. Для одновременного введения в некоторых вариантах осуществления ADC и второе антитело можно вводить в виде отдельной фармацевтической композиции или в одной и той же фармацевтической композиции.

[00392] В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент вводят в терапевтически эффективном количестве или дозе. Диапазон суточной дозы, который можно использовать, составляет от около 0,01 мг/кг до около 500 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 200 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 100 мг/кг, или от около 10 мг/кг до около 50 мг/кг. Дозы, однако, могут варьировать в зависимости от нескольких факторов, включая выбранный путь введения, состав композиции, реакцию пациента, тяжесть состояния, массу субъекта и мнение лечащего врача. Дозировка может быть увеличена или уменьшена с течением времени, как того требует индивидуальный пациент. В определенных случаях пациенту сначала дают низкую дозу, которую затем повышают до эффективной дозы, переносимой пациентом. Определение эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области.

[00393] В некоторых вариантах осуществления повышенная активность, наблюдаемая при применении конкретных комбинированных терапий, описанных в данном документе, имеет определенные преимущества по сравнению с соответствующим монотерапевтическим лечением. Например, в некоторых вариантах осуществления введение ADC и второго антитела в комбинации имеет профиль токсичности, сравнимый с ADC или вторым антителом, когда любое из них вводится в виде монотерапии. В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ADC и/или второго антитела при комбинированном введении меньше, чем при введении в виде монотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение ADC и второго антитела в комбинации обеспечивает более продолжительный ответ по сравнению с соответствующим монотерапевтическим лечением. В некоторых вариантах осуществления введение ADC и второго антитела в комбинации приводит к более длительной выживаемости без прогрессирования по сравнению с соответствующей монотерапией. В некоторых вариантах осуществления введение ADC и второго антитела можно использовать для лечения рецидивирующего рака,

который рецидивирует после монотерапевтического лечения любым агентом по отдельности.

[00394] Путь введения фармацевтической композиции может быть пероральным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, местным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным, местным, внутриочаговым, ректальным, внутрибронхиальным, назальным, чрезслизистым, кишечным, глазным или ушным, или любыми другими способами, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления один или более терапевтических агентов вводят перорально, внутривенно или внутримышечно.

[00395] Совместно вводимые терапевтические агенты можно вводить вместе или по отдельности, одновременно или в разное время. При введении терапевтические агенты независимо друг от друга можно вводить один, два, три, четыре раза в день или чаще или реже, по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления вводимые терапевтические агенты вводят один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления вводимые терапевтические агенты вводят в одно и то же время или времена, например, в виде смеси. В некоторых вариантах осуществления один или более терапевтических агентов вводят в составе с замедленным высвобождением.

[00396] В некоторых вариантах осуществления терапевтические агенты вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления терапевтические агенты вводят последовательно. Например, в некоторых вариантах осуществления первый терапевтический агент вводят, например, за примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 дней или более до введения второго терапевтического агента.

[00397] В некоторых вариантах осуществления лечение, предусмотренное в данном документе, проводят субъекту в течение длительного периода времени, например, в течение по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 дней или дольше.

V. КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ

[00398] В другом аспекте предлагаются композиции и наборы для применения при лечении или профилактике рака у субъекта.

Фармацевтические композиции

[00399] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены фармацевтические композиции для применения в настоящих способах. В некоторых вариантах осуществления ADC вводят в первой фармацевтической композиции, а антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, вводят во второй фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления ADC и антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, вводят в составе одной фармацевтической композиции.

[00400] Руководство по приготовлению составов для использования в настоящем изобретении можно найти, например, в, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., 2006, *supra*; *Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press; Niazi, *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, 2004, CRC Press; и Gibson, *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*, 2001, Interpharm Press, которые

включены в данный документ в качестве ссылки. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть изготовлены способами, известными специалистам в данной области, т.е. с помощью обычных процессов смешивания, растворения, гранулирования, приготовления драже, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации. Следующие способы и наполнители приведены только в качестве примера и никоим образом не ограничивают.

[00401] В некоторых вариантах осуществления один или более терапевтических агентов готовят для доставки в составе с замедленным высвобождением, контролируемым высвобождением, пролонгированным высвобождением, пролонгированным высвобождением или отсроченным высвобождением, например, в полупроницаемых матрицах твердых гидрофобных полимеров, содержащих терапевтический агент. Различные типы материалов с замедленным высвобождением были установлены и хорошо известны специалистам в данной области. Современные лекарственные формы с пролонгированным высвобождением включают таблетки с пленочным покрытием, системы, состоящие из множества частиц или пеллет, матричные технологии с использованием гидрофильных или липофильных материалов и таблетки на восковой основе с порообразующими наполнителями (см., например, Huang, *et al. Drug Dev. Ind. Pharm.* 29:79 (2003); Pearnchob, *et al. Drug Dev. Ind. Pharm.* 29:925 (2003); Maggi, *et al. Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55:99 (2003); Khanvilkar, *et al., Drug Dev. Ind. Pharm.* 228:601 (2002) и Schmidt, *et al., Int. J. Pharm.* 216:9 (2001)). Системы доставки с замедленным высвобождением могут, в зависимости от их конструкции, высвобождать соединения в течение часов или дней, например, в течение 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 часов или более. Обычно составы с замедленным высвобождением могут быть приготовлены с использованием встречающихся в природе или синтетических полимеров, например, полимерных винилпирролидонов, таких как поливинилпирролидон (ПВП); карбоксивиниловые гидрофильные полимеры; гидрофобные и/или гидрофильные гидроколлоиды, такие как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и гидроксипропилметилцеллюлоза; и карбоксиполиметилен.

[00402] Для перорального введения терапевтический агент может быть легко приготовлен путем объединения с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области. Такие носители позволяют составлять соединения в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т.п. для перорального приема пациентом, подлежащим лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем смешивания соединений с твердым эксципиентом, необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления при желании подходящих вспомогательных веществ с получением ядер таблеток или драже. Подходящие эксципиенты включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал,

желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (ПВП). При желании могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или их соль, такая как альгинат натрия.

[00403] Терапевтический агент может быть приготовлен для парентерального введения путем инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Для инъекций соединение или соединения могут быть включены в препараты путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, при желании, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления соединения могут быть приготовлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Препараты для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать рецептурные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[00404] Терапевтический агент можно вводить системно через слизистую оболочку или чрескожно. Для чресслизистого или чрескожного введения в препарате используются пенетранты, соответствующие барьеру, который необходимо преодолеть. Для местного применения препараты изготавливают в виде мазей, кремов, бальзамов, порошков и гелей. В одном варианте осуществления агент для трансдермальной доставки может представлять собой ДМСО. Системы трансдермальной доставки могут включать, например, пластыри. Для чресслизистого введения в препарате используются пенетранты, соответствующие барьеру, который необходимо преодолеть. Такие пенетранты широко известны в данной области техники. Типичные составы для чрескожной доставки включают составы, описанные в патентах США № 6589549; 6544548; 6517864; 6512010; 6465006; 6379696; 6312717 и 6310177, каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки.

[00405] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приемлемый носитель и/или эксципиенты. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и предпочтительно не мешают или иным образом не ингибируют активность терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, перорального, внутрибрюшинного, чрескожного, местного или подкожного введения. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или более физиологически приемлемых соединений, которые действуют, например, стабилизируя композицию или увеличивая или

уменьшая абсорбцию активного агента(ов). Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, композиции, снижающие клиренс или гидролиз активных агентов, или вспомогательные вещества или другие стабилизаторы и/или буферы. Другие фармацевтически приемлемые носители и их составы хорошо известны и обычно описаны, например, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Различные фармацевтически приемлемые эксципиенты хорошо известны в данной области и могут быть найдены, например, в *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (5th ed., Ed. Rowe *et al.*, Pharmaceutical Press, Washington, D.C.).

[00406] Дозировки и желаемая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях по данному изобретению могут варьировать в зависимости от предполагаемого конкретного применения. Определение подходящей дозировки или пути введения находится в компетенции специалиста в данной области. Подходящие дозировки также описаны в данном документе.

Наборы

[00407] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены наборы для лечения субъекта, страдающего раком. В некоторых вариантах осуществления набор содержит:

конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий первое антитело, конъюгированное с разрушителем тубулина, как предусмотрено в данном документе; и второе антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, как предусмотрено в данном документе.

[00408] В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно содержать информационные материалы, содержащие указания (т. е. протоколы) для применения на практике способов по данному изобретению (например, инструкции по применению набора для лечения рака). Хотя информационные материалы обычно содержат письменные или печатные материалы, они не ограничиваются ими. Любой носитель информации, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, предусмотрен настоящим изобретением. Такие носители информации включают, но не ограничиваются ими, электронные носители данных (например, магнитные диски, ленты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и тому подобное. Такие носители информации могут включать адреса интернет-сайтов, на которых предоставлены такие инструктирующие материалы.

VI. ПРИМЕРЫ

[00409] Примеры, обсуждаемые ниже, предназначены только для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться в качестве ограничения изобретения каким-либо образом. Примеры не подразумевают того, что эксперименты, приведенные ниже, представляют собой все или единственные проведенные эксперименты. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но должны учитываться некоторые экспериментальные

ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1: Химиотерапевтические агенты ненаправленного действия нарушают Т-клеточный ответ

1.1 Материалы и методы

[00410] Первичные Т-клетки человека индуцировали для пролиферации с использованием гранул, покрытых CD3/CD28. 20000 обогащенных CD3⁺ Т-клеток, меченных карбоксифлуоресцеиндиацетат-сукцинимидиловым эфиром (CFSE), инкубировали с гранулами анти-CD3 CD28 (1 гранула на 4 Т-клетки) + 10 нг/мл IL-2 в течение 4 дней. Клетки окрашивали красителем LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (ThermoFisher), а живые клетки подсчитывали с помощью проточной цитометрии.

1.2. Результаты

[00411] Как показано на фиг. 1, пролиферация первичных человеческих Т-клеток была значительно снижена при использовании всех протестированных химиотерапевтических препаратов с одним свободным агентом. Эти данные свидетельствуют о том, что системное воздействие химиотерапевтических агентов может ограничивать опосредованную Т-клетками активность у пациентов, в том числе реакцию на иммуно-онкологические агенты (например, антитела, которые связывают активаторы иммунных клеток).

Пример 2: ADC ведотина не ингибируют пролиферацию Т-клеток, несмотря на направленную доставку к Т-клеткам (обработка BV (SGN-35) Т-клеток CD30⁺ CD8)

2.1 Материалы и методы

[00412] Первичные Т-клетки CD8 человека метили CFSE и индуцировали пролиферацию с помощью гранул анти-CD3-CD28 (1 гранула на 4 Т-клетки) + 10 нг/мл IL-2 в течение 4 дней. Во время активации уровень CD30 повышался на поверхности Т-клеток. CD30⁺ CD8 Т-клетки обрабатывали либо CD30-направленным vs-MMAE (брентуксимаб ведотин; BV; SGN-35), либо изотипическим контролем. Клетки окрашивали красителем LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (ThermoFisher), а живые клетки подсчитывали с помощью проточной цитометрии.

2.2 Результаты

[00413] Как показано на фиг. 2, клеточная пролиферация первичных CD30⁺ CD8 Т-клеток человека существенно не изменялась при лечении BV. Эти данные свидетельствуют о том, что системное воздействие ADC ведотина, даже если оно направлено непосредственно на Т-клетки CD8, не влияет на опосредованные CD8 противоопухолевые ответы.

Пример 3. Индукция стресса эндоплазматического ретикулаума превосходит ADC ведотина.

3.1 Материалы и методы

[00414] Индукция стресса эндоплазматического ретикулаума (ЭПР) является одной

из первых и необходимых стадий для инициации иммуногенных клеточных ответов (фиг. 3В). Линии клеток рака поджелудочной железы MIA-PaCa-2 обрабатывали ADC, конъюгированными с различными полезными нагрузками, включая ведотин (MMAE), эмтанзин (DM1), эксатекан DS-8201 (Ex), а также свободный агент, стабилизирующий микротрубочки, паклитаксел в концентрациях IC50, которые вызывают гибель клеток в этой системе. Через 36 или 48 часов после обработки клетки собирали для вестерн-блоттинга и с помощью вестерн-блоттинга оценивали маркер стресса pJNK выше ЭПР (фиг. 3В).

3.1.1 Вестерн-блот

[00415] Обработанные клетки центрифугировали при 14000-16000 об/мин в течение 10 минут и хранили при -20 °С. Осадок клеток ресуспендировали в буфере для образцов 4X BOLT™ LDS (каталог Thermo Fisher № B0007) и лизировали нагреванием при 95 °С в течение 5-10 минут для получения клеточных лизатов. Образцы лизатов обрабатывали на геле с градиентом Bis-Tris 4-12% при 140 В в течение 1 часа 40 минут в буфере MOPS. Затем гель Bis-Tris переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью iBlot2. Мембраны промывали один раз в 1X TBS и инкубировали в течение ночи при 4 °С в блокирующем буфере Licor. Мембраны промывали четыре раза в 1X TBS-T по 5-10 минут каждую. Изображения были обработаны в системе Licor Odyssey с использованием разрешения 84 мкм и автоматической настройки интенсивности.

3.1.2 Анализ индукции люциферазы CNOP

[00416] Оценку последующих путей индукции стресса ЭПР проводили с использованием клеток MIA-PaCa-2, трансдуцированных репортерной клеточной линией люциферазы, управляемой CNOP. CNOP является последним шагом в каскаде реакций на стресс ЭПР, и уровни его экспрессии увеличиваются при стрессе ЭПР. В оценке использовались несколько полезных нагрузок ADC в клинической разработке (фиг. 3А). Индукцию CNOP измеряли с использованием репортерной системы для определения активности CNOP в соответствии с инструкциями производителя (система анализа люциферазы Bright-Glo™, Promega). Вкратце, 100 000 клеток/лунку высевали в 96-луночный плоскодонный прозрачный планшет (аликвота 150 мкл на лунку). Аликвоты по 200 мкл среды распределяли во внешние лунки планшета, чтобы создать «одеяло» среды вокруг лунок клеток. Через 24, 48 и 72 часа планшеты вынимали из инкубатора и давали им нагреться до комнатной температуры. Из лунок удаляли по 100 мкл среды. В каждую лунку добавляли по 100 мкл реагента BrightGlo. Планшет встряхивали не менее двух минут перед считыванием. Для считывания данных с планшета использовали стандартный протокол Envision CTG для 96 лунок.

3.2 Результаты

[00417] Как показано на фиг. 3С-Е, лечение ADC на основе ауристатина (MMAE-ADC или MMAF-ADC) было единственным условием, которое, как было обнаружено, индуцировало сигнал pJNK раннего ответа на стресс ЭПР различных протестированных полезных нагрузок ADC. Индукция стресса ЭПР связана с разрушением микротрубочек,

поскольку ЭПР требует, чтобы интактные микротрубочки расширялись и сокращались, чтобы удовлетворить потребности клетки в трансляции белка. Способность MMAE как агента, разрушающего микротрубочки, индуцировать этот стресс ЭПР иллюстрируется показанными данными.

[00418] Фиг. 3D-E демонстрируют, что CHOP, последующий сигнал в пути стресса ЭПР, в значительной степени индуцируется ADC MMAE, и что последующие пути к стрессу ЭПР также управляются ADC MMAE по-разному по сравнению с другими полезными нагрузками.

Пример 4: потенциал ICD различных полезных нагрузок клинического ADC

4.1 Материалы и методы

[00419] Классические маркеры ICD включают поверхностное воздействие кальретикулина и высвобождение АТФ и HMGB1, которые происходят одновременно с индукцией стрессовой реакции ЭПР. Эти молекулы считаются сигналами опасности и активируют врожденные иммунные клетки и усиливают специфические Т-клеточные ответы на опухолевые антигены. Раковые клетки MIA-PaCa-2 обрабатывали концентрациями IC50 полезных нагрузок, несущих ADC, которые в настоящее время находятся на клинической стадии, то есть MMAE, DM1 и Exatecan (Ex). Затем обработанные клетки анализировали на индукцию маркера ICD. Цисплатин использовали в качестве отрицательного контроля, поскольку он способен вызывать гибель клеток, но неизвестно, вызывает ли он ICD.

[00420] Высевали 100 000-150 000 клеток на лунку в 96-луночном планшете. Клеткам давали достичь 50-60% слияния. Среду удаляли и добавляли свежую культуральную среду на лунку с клетками. В каждую лунку с клетками добавляли 1 мкг/мл 1 мкМ препарата. Через 24 часа собирали 250 мкл (для анализа высвобождения АТФ) или 200 мкл (для анализа HMGB1) среды и переносили в маркированную пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл. Каждую пробирку с образцом центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 1 мин. 50 мкл среды переносили в лунку 96-луночного планшета с прозрачным дном. В каждую лунку добавляли по 50 мкл CTG. Планшет встряхивали в течение 1-2 мин. Для чтения планшета использовали Envision Plate Reader.

[00421] Уровни высвобождения HMGB1 контролировали по интенсивности люминесценции на лунку с использованием планшетного ридера Envision. Уровни высвобождения HMGB1 и АТФ были зарегистрированы как кратное изменение по сравнению с фоновыми значениями для необработанных образцов. Полученные значения были преобразованы в текстовый файл, экспортированы и проанализированы с использованием Excel и GraphPad Prism.

4.2 Результаты

[00422] Как показано на фиг. 4A, vc-MMAE был эффективен в стимулировании высвобождения АТФ по сравнению с другими протестированными полезными нагрузками. Хотя высвобождение HMGB1 связано с индукцией ICD, его высвобождение также наблюдается, когда клетки начинают подвергаться некрозу, и не связано напрямую с

активным вовлечением иммунных клеток. Обработка клеток MIA-PaCa-2 агентами, разрушающими микротубулин γ -MMAE и DM1, приводила к сильному высвобождению HMGB1, что отличалось от ингибитора топоизомеразы Exatecan (Ex) (фиг. 4B).

Пример 5: Оценка иммунной активации полезной нагрузки ADC

5.1 Материалы и методы

5.1.1 Клетки

[00423] Как показано на фиг. 5A, ADC, конъюгированные с MMAE, разрушают микротрубочки, что приводит к стрессовой реакции ЭПР, что приводит к иммуногенной гибели клеток (ICD). Умиряющие клетки, в свою очередь, высвобождают иммуноактивирующие молекулы - молекулярные структуры, ассоциированные с повреждением (DAMP), такие как HSP70, HSP90, АТФ, HMGB1 и кальретикулин (CRT). Эти DAMP могут связываться с такими рецепторами, как LPR1/CD91, P2RX7, P2RY2, AGER, TLR2 и TLR4, тем самым активируя врожденную иммунную систему. Эта активация приводит, например, к активизации белков, таких как CD80, CD86, HLA-DR и CD40, увеличению экспрессии МНСII на моноцитах и высвобождению цитокинов, таких как CXCL-10/IP10 и IL-12, тем самым инициация противоопухолевого Т-клеточного ответа. Такие ответы Т-клеток могут быть дополнительно усилены ингибиторами PD-1/L1. Здесь иммунологические последствия ICD оценивали в культурах мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC). Раковые клетки, подвергшиеся воздействию ADC, конъюгированных с различными полезными нагрузками, добавляли к PBMC.

[00424] Раковые клетки L540cy, подвергшиеся воздействию ADC или свободного лекарственного средства в концентрациях EC50, в течение 18 часов (при 37 °C в 5% CO₂). Промывали и 250 мкл PBMC, суспендированных в концентрации 10×10⁶ клеток/мл, добавляли к линиям раковых клеток, убитым клеткам, в течение 48 часов. Брали среду для культивирования тканей и измеряли цитокины с помощью оценки Luminex.

[00425] Лечение проводилось в трех повторах для 2 независимых доноров PBMC.

5.1.2 Поверхностная экспрессия костимулирующей молекулы

[00426] После обработки осадки клеток ресуспендировали в 50 мл буфера BD FACs и переносили в 96-луночные круглодонные титрационные микропланшеты. Fc-рецепторы блокировали человеческими 100 мкг/мл Fc-фрагментами в течение 30 минут на льду. Мастер-микс, состоящий из PE-HLA-DR (МНСII) и APC-CD14, разведенных в соотношении 1:100, готовили в буфере BD FACs, содержащем 100 мг/мл очищенных Fc-фрагментов человека. 10 мкл мастер-микса добавляли в каждую лунку, содержащую 90 мкл ресуспендированных клеток, и образцы инкубировали в течение 1 часа на льду. Затем клетки центрифугировали при 400 xg в предварительно охлажденной центрифуге Eppendorf 5810R в течение 5 минут. Супернатант удаляли и клетки промывали 200 мл буфера BD FACs. Промывку проводили дважды, клетки ресуспендировали в 200 мл буфера FACs и образцы анализировали на проточном цитометре Attune. Среднюю флуоресценцию HLA-DR определяли с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo.

5.1.3 Продукция цитокинов

[00427] После обработки совместные культуры РВМС/раковых клеток вращали с помощью адаптера для планшетов в Eppendorf 5810R при 800 об/мин в течение 5 минут. Супернатант сыворотки или культуры ткани удаляли и переносили в 96-луночные штативы для пробирок, а образцы замораживали при -80°C до обработки. Супернатанты замороженных культур тканей и сыворотку размораживали в течение ночи при 4°C и обрабатывали для продукции цитокинов с использованием набора Luminex Multiplex Kit от Millipore.

[00428] Образцы супернатанта тканевой культуры и сыворотки обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, аналитические планшеты промывали 200 мкл промывочного буфера на лунку с последующим добавлением 25 мкл стандарта или буфера, 25 мкл матрицы или образца и 25 мкл мультиплексированных анализируемых шариков в каждую лунку. Образцы инкубировали в течение ночи при энергичном встряхивании при 4°C . Планшеты для анализа дважды промывали промывочным буфером.

[00429] В каждую лунку добавляли детектирующие антитела (25 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли 25 мкл стрептавидин-фикоэритрина (SA-PE) и образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Планшет дважды промывали промывочным буфером и гранулы ресуспендировали в 150 мкл проточной жидкости. Образцы анализировали с использованием систем Luminex MagPix в сочетании с программным комплексом Xponent. Уровни цитокинов рассчитывали по стандартной кривой.

5.2 Результаты

[00430] Наблюдалась врожденная активация клеток, о чем свидетельствует увеличение маркеров поверхностной активации (МНСII) и высвобождение воспалительных цитокинов (CXCL-10/IP10) (ФИГ. 5B-C). Клетки врожденного иммунитета активируются при воздействии на опухолевые клетки, обработанные vs-MMAE. Активация иммунных клеток с помощью vs-MMAE была более надежной, чем активация с помощью других полезных нагрузок ADC (ФИГ. 5B-C).

[00431] Vs-MMAE-опосредованная ICD представляет собой регулируемую гибель клеток, которая активирует адаптивные иммунные ответы против антигенов из мертвых и умирающих опухолевых клеток и обеспечивает устойчивую активацию врожденных иммунных клеток и последующие цитотоксические Т-клеточные ответы, направленные на специфические антигены опухолевых клеток. В данном документе было продемонстрировано, что vs-MMAE уничтожает раковые клетки, вызывая увеличение поверхностного МНСII и высвобождение врожденного цитокина CXCL10, сильного хемотаксического и воспалительного медиатора, из моноцитов/макрофагов после поглощения мертвых клеток.

Пример 6: Оценка полезной нагрузки на основе трастузумаба

6.1 Материалы и методы

[00432] Была оценена способность конъюгатов трастузумаба ADC, несущих

полезные нагрузки на различных клинических стадиях, индуцировать стресс ЭПР и последующие маркеры ICD АТФ и НМGB1. Используемые полезные нагрузки: DM1, MMAE и эксатекан (Ex).

6.2 Результаты

[00433] Было сделано два наблюдения: (1) трастузумаб, конъюгированный с vcMMAE, вызывал наиболее сильную стрессовую реакцию ЭПР, которая была связана с индукцией АТФ и НМGB1; и (2) маркер поздней гибели клеток НМGB1 оказался повышенным для других классов полезной нагрузки, что указывает на то, что вторичный некроз может быть связан с этими классами полезной нагрузки, а не с явным ICD (ФИГ. 6С-Е). Результаты в данном документе аналогичны результатам, описанным выше в примере 4, в котором использовали клетки Mia-PaCa-2 (ФИГ. 4А-В).

Пример 7: Индукция маркеров стресса ЭПР на ранней стадии (активация сигнализации JNK) обычно лучше для ADC MMAE

7.1 Материалы и методы

[00434] Как описано в примере 5 и показано на ФИГ. 5А, путь ICD включает различные аспекты. Этот путь дополнительно проиллюстрирован на ФИГ. 7А. Как показано на ФИГ. 7А и отмечалось выше, разрушитель тубулина, такой как MMAE, на начальной стадии разрушает микротрубочки, тем самым вызывая стресс ЭПР и ICD. ICD, в свою очередь, вызывает высвобождение иммуноактивирующих молекул, таких как DAMP, АТФ, НМGB1 и CRT. Эти молекулы могут впоследствии активировать врожденные клетки, которые способны инициировать противоопухолевый Т-клеточный ответ и могут индуцировать Т-клеточную память. Такие ответы Т-клеток могут быть дополнительно усилены комбинацией с другими иммуномодуляторами, такими как активаторы иммунных клеток, описанные в данном документе. Несколько из следующих примеров сообщают о результатах исследований, показывающих эффективность MMAE по сравнению с другими полезными нагрузками ADC для индукции вышеупомянутых различных аспектов пути ICD.

[00435] Индукция стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) является одним из первых шагов для инициации иммуногенных клеточных ответов, а активация передачи сигналов JNK является индикатором стресса ЭПР (см. ФИГ. 3В). Для оценки этого показателя клетки рака поджелудочной железы MIA-PaCa-2 обрабатывали 1 мкг/мл ADC, конъюгированными с различными полезными нагрузками, как показано на ФИГ. 7В. После 24 или 48 часов обработки клетки собирали для вестерн-блоттинга и оценивали маркер стресса ЭПР pJNK с помощью иммуноанализа Simple Western (Wes™, Protein Simple).

[00436] Обработанные клетки отделяли от культуральных планшетов с помощью клеточных скребков. Взвешенные клетки центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин, 4 °С. Супернатант удаляли, а клеточные осадки ресуспендировали в лизирующем буфере (содержащем ингибиторы протеазы и фосфатазы). После не менее 10 минут на льду образцы центрифугировали при 13 500 g в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса. Лизирующий раствор перемещали в отдельные пробирки и хранили при -80 °С.

Количество белка лизата определяли количественно с использованием набора для анализа белка Bio-Rad DC Protein Assay Kit (кат. № 5000112), чтобы учесть одинаковую загрузку дорожек. Образцы лизатов и реагенты загружали в планшет для анализа и помещали в Wes™. Phospho-JNK идентифицировали с использованием первичного антитела (Cell Signaling Technologies, кат. № 9251S) и иммунозондировали с использованием конъюгированного с HRP вторичного антитела (Protein Simple, кат. № 042-206) и хемилюминесцентного субстрата. Результирующий хемилюминесцентный сигнал был обнаружен, количественно оценен и отображен интегрированным программным обеспечением Compass.

7.2 Результаты

[00437] Как показано на фиг. 7C-F, из различных протестированных полезных нагрузок ADC, обработка MMAE-ADC (SGD-1006) была одним из самых сильных индукторов фосфорилирования JNK, ранней реакции на стресс ЭПР. В целом, обработка MMAE-ADC генерировала более сильные сигналы pJNK по сравнению с обработкой майтанзин-ADC (ФИГ. 7C), камптотецин-ADC (ФИГ. 7D), антрациклин-ADC (ФИГ. 7E) и калихеамицин-ADC (ФИГ. 7F). (hIgG на ФИГ. 7C-F представляют собой нецелевые конъюгаты с той же полезной нагрузкой, что и соответствующий ADC.) Единственным исключением была обработка ADC, содержащим антрациклин mp-EDA-PNU (SGD-8335), который генерировал сигнал pJNK, сравнимый с сигналом при обработке MMAE-ADC (ФИГ. 7E). Индукция стресса ЭПР связана с разрушением микротрубочек, поскольку ЭПР требует, чтобы интактные микротрубочки расширялись и сокращались, чтобы удовлетворить потребности клетки в трансляции белка. Способность MMAE как агента, разрушающего микротрубочки, индуцировать этот стресс ЭПР иллюстрируется показанными данными.

Пример 8. Индукция маркеров стресса ЭПР на поздних стадиях (индукция СНОР) обычно лучше для MMAE ADC

8.1 Материалы и методы

[00438] СНОР является последним шагом в каскаде реакций на стресс ЭПР, и уровни его экспрессии увеличиваются при стрессе ЭПР (см. ФИГ. 3B). Оценку этого прямого пути к стрессу ЭПР проводили с использованием клеток MIA-PaCa-2, трансдуцированных СНОР-управляемым репортером люциферазы (Signosis, Inc.). В оценке использовались несколько ADC, содержащих разные полезные нагрузки. См. ФИГ. 7A.

[00439] Индукцию СНОР в клетках MIA-PaCa-2 измеряли путем обнаружения сигнала люциферазы (система анализа люциферазы Bright-Glo™, Promega). Вкратце, 10 000 клеток/лунку высевали в 96-луночные плоскодонные прозрачные планшеты с черными стенками по 75 мкл на лунку. ADC дозировали по 25 мкл на лунку для достижения конечной концентрации IC₅₀. Через 36, 48 и 72 часа планшеты вынимали из инкубатора и давали им нагреться до комнатной температуры. В каждую лунку добавляли по 100 мкл реагента Bright-Glo. Планшет встряхивали не менее пяти минут перед считыванием. Для считывания данных с планшета использовали стандартный протокол Envision CTG для 96 лунок.

8.2 Результаты

[00440] Как показано на ФИГ. 8A-D, обработка ADC, содержащими *vc*-ММАЕ (SGD-1006), приводила к индукции СНОР, которая была сравнима с индукцией СНОР при лечении ADC, содержащими мертанзин (SPP-5351) или равтанзин (SPDB-5352) (ФИГ. 8A), и после обработки ADC, содержащими *mp*-EDA-PNU (SGD-8335) или *mp*-Gluc-DXZ (SGD-8248) (ФИГ. 8C). Кроме того, лечение ADC, содержащими ММАЕ (SGD-1006), приводило к индукции СНОР, которая была сильнее, чем индукция СНОР при лечении ADC, содержащими камптотецины (ФИГ. 8B), АТ (SGD-4830) (ФИГ. 8D) или тезерин (SGD-7455) (ФИГ. 8D). Напротив, обработка ADC, содержащими озогамицин (SGD-8677), приводила к индукции СНОР, которая была несколько сильнее, чем при обработке ADC, содержащими *vc*-ММАЕ (SGD-1006) ФИГ. 8D).

Пример 9. Индукция иммуностимулирующих DAMP обычно превосходит ADC ММАЕ.

9.1 Материалы и методы

[00441] ICD вызывает высвобождение иммуноактивирующих молекул - молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP), таких как АТФ, HMGB1 и CRT. Для измерения ICD высвобождение АТФ и HMGB1 оценивали следующим образом. Раковые клетки MIA-PaCa-2 обрабатывали ADC в концентрациях IC₅₀ с различными полезными нагрузками для оценки индукции маркера ICD *in vitro*. См. ФИГ. 7A.

[00442] 200 000 клеток высевали на лунку в 6-луночные планшеты TC и оставляли на ночь прикрепляться к планшету. Клеткам достигали 50-60% слияния. В каждую лунку для обработки добавляли ADC в концентрации IC₅₀. Через 72 часа собирали 500 мкл (для анализа высвобождения АТФ) или 750 мкл (для анализа HMGB1) культурального супернатанта и переносили в маркированную пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл. Каждую пробирку с образцом центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 1 минуты. 50 мкл среды переносили в три лунки в 96-луночном планшете с прозрачным дном. В каждую лунку добавляли 50 мкл CellTiter-Glo® (Promega). Планшет встряхивали в течение 1-2 минуты. Для считывания данных с планшета использовали стандартный протокол CTG для 96-луночного планшета Envision Plate Reader. Затем супернатант каждого пробирочного образца использовали для измерения уровней высвобождения HMGB1, которые количественно определяли с помощью ELISA (IBL). Уровни высвобождения HMGB1 и АТФ были зарегистрированы как кратное изменение по сравнению с фоновыми значениями для необработанных образцов. Полученные значения были преобразованы в текстовый файл, экспортированы и проанализированы с использованием Excel и GraphPad Prism.

9.2 Результаты

[00443] Как показано на ФИГ. 9A-D, обработка ADC, содержащими *vc*-ММАЕ (SGD-1006), приводила к высвобождению АТФ и высвобождению HMGB1, которые были более сильными, чем при обработке ADC, содержащими майтанзины (ФИГ. 9A), и при обработке ADC, содержащими камптотецины (ФИГ. 9B). Кроме того, обработка ADC, содержащими *vc*-ММАЕ (SGD-1006), приводила к высвобождению АТФ и высвобождению

HMGB1, более сильному, чем при обработке ADC, содержащими тезерин (SGD-7455) или ауристин АТ (SGD-4830) (ФИГ. 9D).

[00444] Лечение ADC, содержащими vc-MMAE (SGD-1006), приводило к высвобождению АТФ и высвобождению HMGB1, что сравнимо с таковым при лечении ADC, содержащими антрациклины (по сравнению с HMGB1, высвобождение АТФ менее выражено) (ФИГ. 9C) и при лечении с помощью ADC, содержащие озогамицин (SGD-8677) (ФИГ. 9D).

Пример 10. Активация врожденных клеток (высвобождение цитокинов), как правило, превосходит ADC MMAE.

10.1 Материалы и методы

[00445] DAMP активируют врожденные клетки, которые могут инициировать противоопухолевый Т-клеточный ответ. Например, они могут повышать экспрессию МНСII на моноцитах и высвобождение врожденных цитокинов, таких как CXCL-10/IP10. Экспрессию МНСII и CXCL-10/IP10 оценивали следующим образом.

[00446] Раковые клетки L540cy, подвергшиеся воздействию ADC или паклитаксела в концентрациях IC₅₀ в течение 24 часов (при 37 °C в 5% CO₂), промывали и к убитым раковым клеткам добавляли 0,2×10⁶ клеток/лунку PBMC в соотношении 1:10 L540cy:PBMC. Полезная нагрузка ADC, использованных в этом эксперименте, описана на ФИГ. 7A. Совместные культуры инкубировали в течение 48 часов. Через 24 часа собирали супернатанты клеточных культур и измеряли цитокины с помощью оценки Luminex, включая врожденный цитокин CXCL-10/IP10.

[00447] После 48-часовой совместной инкубации осадки клеток ресуспендировали в 50 мкл буфера BD FACs и переносили в 96-луночные планшеты с круглым дном для микротитрования. Fc-рецепторы блокировали человеческими Fc-фрагментами в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 минут на льду. Мастер-микс, включающий PE-Cy7 анти-HLA-DR (МНСII), PE анти-CD14, PE-Dazzle 594 анти-CD11b, BV605 анти-CD3 и BV421 анти-CD19, разведенные в соотношении 1:100, был приготовлен в BD. Буфер FACs, содержащий 100 мкг/мл очищенных Fc-фрагментов человека. 10 мкл мастер-микса добавляли в каждую лунку, содержащую 90 мкл ресуспендированных клеток, и образцы инкубировали в течение 1 часа на льду. Затем клетки центрифугировали при 400 x g в предварительно охлажденной центрифуге Eppendorf 5810R в течение 5 минут. Супернатант удаляли и клетки промывали 200 мл буфера BD FACs. Промывку проводили дважды, клетки ресуспендировали в 200 мл буфера FACs. Образцы анализировали на проточном цитометре Attune. Моноциты были определены как CD14+CD11b+CD3-CD19-. Среднюю флуоресценцию HLA-DR определяли с использованием программного обеспечения для анализа FlowJo.

10.2 Результаты

[00448] Как показано на ФИГ. 10A-D, обработка ADC, содержащими MMAE (SGD-1006), приводила к экспрессии моноцитов МНС II, которая была сравнима или превышала экспрессию при обработке ADC, содержащими другие полезные нагрузки, включая

майтанзины (ФИГ. 10А), камптотецины (ФИГ. 10В), антрациклины (ФИГ. 10С), калихеамицин озогамин (SGD-8677) и тезерин РВD (SGD-7455) (ФИГ. 10D). Лечение ADC, содержащими MMAE (SGD-1006), также приводило к высвобождению врожденного цитокина CXCL-10/IP10, которое было неизменно выше, чем при лечении ADC, содержащими такие же полезные нагрузки (ФИГ. 10А-D).

10.3 Данные про превосходный потенциал ICD ADC MMAE

[00449] Как показано в этих экспериментах, MMAE-ADC могут индуцировать различные признаки ICD и различные иммуногенные клеточные ответы, включая индукцию стресса ЭПР ранней стадии (например, активация JNK), индукцию стресса позднего ЭПР (например, индукция CHOP), индукцию иммуноактивирующих молекул (например, высвобождение АТФ и HMGB1) и активацию врожденных иммунных клеток (например, активацию макрофагов). Ни одна из других протестированных полезных нагрузок ADC не давала последовательно эти отличительные признаки ICD. На ФИГ. 10Е представлена сводка потенциала ICD (измеряемого по указанным выше признакам) ADC с различными типами полезной нагрузки и иллюстрирующая общее превосходство разрушителя тубулина, в частности MMAE.

Пример 11. Дифференциальное связывание FcγR с FcγRIIIa, FcγRIIIb или FcγRIIIa на основе каркаса Fc.

11.1 Материалы и методы

[00450] Антитела SEA-CD40, APX005M, ADC-1013 и селикрелумаб (ФИГ. 11А) оценивали на связывание FcγR с использованием проточной цитометрии с клетками СНО, трансфицированными человеческими FcγRIIIa, FcγRIIIb или FcγRIIIa. Клетки СНО инкубировали с увеличивающимися концентрациями антител, и вторичное антитело использовали для оценки связывания, контролируемого с помощью проточной цитометрии.

[00451] Для каждой клеточной линии 50 миллионов клеток однократно промывали в 50 мл PBS. Клетки снова подсчитывали и ресуспендировали при концентрации 2,2 миллиона клеток/мл в буфере для окрашивания BD. Клетки высевали в 96-луночный круглодонный планшет по 0,1 мл клеток на лунку.

[00452] Растворы антител разводили до следующих конечных концентраций: 3 мг/мл, 1 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,01 мг/мл, 0,003 мг/мл, 0,001 мг/мл, 0,0003 мг/мл. Каждый раствор антител разводили в 10 раз (т.е. 11 мкл каждого раствора антител добавляли к 89 мкл среды) для получения следующих концентраций: 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,03, 0,01, 0,003, 0,001 и 0,0003 мкг/мл. Из клеток удаляли среду и клетки промывали средой. В каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора антител. Растворы антител добавляли с уменьшением концентрации в вертикальном направлении. После 1-часовой инкубации при 4°C планшет центрифугировали и каждую лунку с клетками дважды промывали 200 мкл буфера для окрашивания BD. Осажденные клетки ресуспендировали путем встряхивания планшета.

[00453] Затем готовили конъюгированное с PE антитело против IgG Fc человека (разведение 1/50 концентрации 1 мг/мл=насыщающая концентрация 33 мкг/мл) в буфере

для окрашивания BD. Раствор инкубировали в течение 30 мин в темноте в холодильнике. После инкубации планшет центрифугировали, удаляли супернатант и дважды промывали клетки буфером для окрашивания BD по 200 мкл на лунку. Клетки ресуспендировали в PBS+1% параформальдегида и хранили при 4 °C до анализа с помощью проточной цитометрии. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра Attune. Точки данных для среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции (средняя флуоресценция GEO) были нанесены на график с использованием Graphpad Prism.

11.2 Результаты

[00454] APX005 S267E проявлял наивысшую аффинность к FcγRIIIa и FcγRIIb (ФИГ. 11B-D). SEA-CD40 имел самую высокую аффинность к FcγRIIIa и самую низкую аффинность к FcγRIIb (ФИГ. 11B-D). Данные демонстрируют способность различных остовов Fc воздействовать на связывание с разными FcγR. Нефукозилированный остов SEA-CD40 проявляет дифференцированное связывание по сравнению с другими антителами к CD40, находящимися в разработке, поскольку он связывает активирующие, но не ингибирующие FcγR (ФИГ. 11B-D).

Пример 12. Индуцированная гибель клеток в клетках MIA-PaCa-2.

12.1 Материалы и методы

[00455] Опухолевые клетки поджелудочной железы MIA-PaCa-2 индуцировали для гибели клеток с помощью концентраций EC50 агента, не индуцирующего ICD, Abgaxane (который действует аналогично паклитакселу в примере 3 выше), или агентов, индуцирующих 2 ICD, оксалиплатина или vc-MMAE. Клетки инкубировали с каждым агентом в течение 18 часов. Затем опухолевые клетки добавляли к РВМС человека плюс различные CD40-направленные агонисты (1 мкг/мл) с различными каркасами Fc (ФИГ. 11A) и иммунную активацию оценивали через 48 часов.

12.2 Результаты

[00456] SEA-CD40 в сочетании с vc-MMAE ADC убивал опухолевые клетки, по меньшей мере, частично, индуцируя усиленное высвобождение иммуноактивирующих цитокинов (CXCL10 и IFNγ; ФИГ. 12A-B), в то время как другие агонисты CD40 с отличающимися каркасами Fc амплифицируют цитокины, подавляющие иммунитет (IL-10 и MDC; ФИГ. 12C-D). Этот пример иллюстрирует улучшенный иммунный ответ, наблюдаемый с каркасом Fc, который обладает повышенным связыванием с FcγRIIIa.

Пример 13: Дифференциальная активация иммунитета к апоптотическим клеткам меланомы как функция каркаса Fc

13.1 Материалы и методы

[00457] Две клеточные линии меланомы, SK-MEL 12 и SK-MEL 28, обрабатывали Abgaxane, оксалиплатином или vc-MMAE в концентрациях EC50 в течение 18 часов. К обработанным меланомным/опухолевым клеткам добавляли РВМС человека плюс 1 мкг/мл различных CD40-направленных агонистов с разными Fc-скелетами (ФИГ. 11A). Иммунную активацию оценивали через 48 часов.

13.2 Результаты

[00458] SEA-CD40 в сочетании с ADC vs-MMAE индуцировал высвобождение иммуноактивирующих цитокинов (CXCL10; ФИГ. 13А-В), в то время как другие агонисты CD40 усиливали иммунодепрессивные цитокины (IL-10; ФИГ. 13С-Д).

Пример 14: Дифференциальная иммунная активация различных типов апоптотических опухолевых клеток в зависимости от каркаса Fc

14.1 Материалы и методы

14.1.1 Клетки

[00459] Гибель клеток индуцировали в опухолевых клетках меланомы, легкого, молочной железы и поджелудочной железы с использованием агента, индуцирующего ICD, оксалиплатина или vs-MMAE при концентрациях EC50 и инкубации в течение 18 часов. Обработанные опухолевые клетки добавляли к РВМС человека и различным CD40-направленным агонистам с различными каркасами Fc (ФИГ. 11А). Иммунную активацию оценивали через 48 часов. РВМС и линии опухолевых клеток обрабатывали, как описано выше в примере 5. Вместо раковых клеток MIA-PaCa-2 (которые использовали в примере 5) использовали следующие клеточные линии: линии клеток меланомы SK-MEL 12 и SK-MEL 28, клеточная линия рака легкого A549, клеточная линия рака молочной железы MDA-MB-468 и клеточная линия рака поджелудочной железы MIA-PaCa-2. Клетки обрабатывали в трех повторностях.

14.1.2 Продукция цитокинов

[00460] Продукцию цитокинов оценивали, как описано выше в примере 5.

14.2 Результаты

[00461] SEA-CD40 в сочетании с ADC vs-MMAE приводил к усиленному высвобождению иммуноактивирующих цитокинов (CXCL10 и IFN γ ; ФИГ. 14А и 14С), в то время как другие агонисты CD40 усиливали иммунодепрессивные цитокины (IL-10; ФИГ. 14В). Как и в примерах 12 и 13, этот пример демонстрирует улучшенный иммунный ответ, наблюдаемый с каркасом Fc, который обладает повышенным связыванием с Fc γ RIIIa по сравнению с другими каркасами Fc.

Пример 15: Синергический эффект комбинации нефукозилированного антитела SEA-CD40 и ADC на основе ауристатина

15.1 Материалы и методы

[00462] Трансгенным мышам CD40 человека имплантировали клетки A20, сконструированные для экспрессии антигена Thy 1.1. Опухолевые клетки имплантировали подкожно в бок на 0-й день. Когда средний размер опухоли (измеряемый по формуле Объем (мм³)=0,5 * длина * ширина², где длина - большее измерение) достигал 100 мм³, мышей рандомизировали в лечебные группы по 5 мышей в группе. Затем животных обрабатывали указанными препаратами внутривенно; каждую обработку проводили один раз каждые три дня, всего три обработки. Исходные концентрации антител разводили до соответствующей концентрации и вводили животным в объеме 100 мкл. Конечные дозы составляли 1 мг/кг для SEA-CD40 и 1 мг/кг для ADC vs-MMAE, направленного на Thy1.1. Длину опухоли, ширину опухоли и массу мышцы измеряли на протяжении всего

исследования, а объем опухоли рассчитывали по приведенной выше формуле. За животными наблюдали до тех пор, пока не измеряли объем опухоли, пока он не достигал $\sim 1000 \text{ мм}^3$, после чего животных подвергали эвтаназии.

15.2 Результаты

[00463] Как показано на ФИГ. 15, обработка модели опухоли A20 субтерапевтической дозой SEA-CD40 приводило к уменьшению роста опухоли и задержке роста опухоли. Точно так же конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий vs-MMAE, показал легкую задержку роста опухоли. Однако, когда два агента вводили животным в тандеме, наблюдались излечивающие противоопухолевые ответы. Эти данные демонстрируют синергетический эффект при объединении усиленного антитела SEA-CD40 с иммуногенной химиотерапией, вызывающей гибель клеток, доставляемой через ADC, включая возможность достижения лечебного ответа.

Пример 16: Дифференциальная активность в различных линиях опухолевых клеток, обработанных ADC на основе ауристатина, нацеленным на опухолеассоциированный антиген, и антитела TIGIT с различными каркасами Fc

16.1 Материалы и методы

[00464] В этом примере использовали пять различных линий раковых клеток человека, SK-MEL 28 (меланома), MDA-MB-468 (молочная железа), CORL23 (легкое), A549 (легкое) и HT-26 (толстая кишка). Каждую клеточную линию обрабатывали в течение 18 часов 1 мкг/мл нацеленного на опухоль ADC антитело-vsMMAE с соотношением лекарственное средство-антитело (DAR), равным 4. После инкубации при 37°C опухолевые клетки промывали и к PBMC человека добавляли 1 мкг/мл антитела к TIGIT, как показано на ФИГ. 16. Используемые антитела к TIGIT имели различные уровни эффекторной функции каркаса, при этом антитело LALA TIGIT не имело связывания с Fc γ R, а антитело SEA-TIGIT имело усиленное связывание с Fc γ R (повышенное связывание с активирующим Fc γ 3aR и пониженное связывание с ингибиторным Fc γ RIIbR. В приведенной ниже таблице D показаны относительные активности различных антител к TGT. Эти культуры иммунных клеток, обработанные антителом к TIGIT и мертвые/отмирающие опухолевые клетки инкубировали в течение дополнительных 48 часов. Супернатант для каждого состояния собирали и оценивали с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя по индукции цитокинов.

Таблица D: Антитела к TGT				
	CD155	Истощение T reg	ответ CD8 T- клеток	активация APC
Анти-TIGIT LALA	++	-	-	-

Анти-TIGIT IgG1	++	++	++	+
SEA-TGT	++	++++	+++	+++

16.2 Результаты

[00465] Как показано на ФИГ. 16, мертвые/умирающие опухолевые клетки при инкубации PBMC, которые не включали никаких дополнительных иммуномодулирующих обработок («Необработанные» на ФИГ. 16), имели некоторую стимуляцию иммунных клеток, о чем свидетельствует продукция цитокина IP10, родственного врожденному интерферону I типа. Уровень активации IP10 зависел от типа опухолевых клеток, поскольку SK-MEL 28, MDA-MB-468 и CORL23 индуцировали гораздо большую активацию PBMC, чем клетки A549 или HT-26. Тем не менее, независимо от опухолевых клеток, последующее добавление mAb SEA-TGT к TIGIT с усиленной эффекторной функцией к совместным культурам привело к дальнейшему усилению активации иммунных клеток по всем направлениям. Для клеточных линий, где одной совместной инкубации с мертвыми клетками было недостаточно для существенной активации, включение нефукозилированного mAb TIGIT SEA-TGT показало наиболее существенное увеличение, демонстрирующее его сильную активирующую способность. В этих клетках основное антитело IgG1 к TIGIT было способно стимулировать активацию иммунных клеток, которая была приглушенной по сравнению с усиленным mAb. LALA-версия анти-TIGIT, которая не обладает способностью связывать FcγR, была неактивна в отношении какой-либо иммунной активации.

Пример 17: Дифференциальная активность в различных линиях опухолевых клеток, обработанных ADC на основе ауристатина, нацеленным на опухолеассоциированный антиген, и антитела TIGIT с различными каркасами Fc

17.1 Материалы и методы

[00466] Шесть различных линий раковых клеток человека: HT-26 (толстая кишка), A549 (легкое), CORL23 (легкое), MDA-MB-468 (молочная железа), SK-MEL 28 (меланома) и Mia-PaCa-2 (поджелудочная железа) были использованы в этом примере. Каждую клеточную линию обрабатывали в течение 18 часов 1 мкг/мл нацеленного на опухоль ADC антитело-vcMMAE с соотношением лекарственное средство-антитело (DAR), равным 4. После инкубации при 37 °C опухолевые клетки промывали и к PBMC человека добавляли 1 мкг/мл антитела к TIGIT, как показано на ФИГ. 16. Эти культуры иммунных клеток, обработанные антителом к TIGIT и мертвые/отмирающие опухолевые клетки инкубировали в течение дополнительных 48 часов. Супернатант для каждого состояния собирали и оценивали с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя по индукции цитокинов.

17.2 Результаты

[00467] Как показано на ФИГ. 17, мертвые/умирающие опухолевые клетки при

инкубации РВМС, которые не включали никаких дополнительных иммуномодулирующих обработок («Необработанные» на ФИГ. 16) имели некоторую стимуляцию иммунных клеток, о чем свидетельствует продукция адаптивного цитокина IFN γ . Уровень активации IFN γ зависел от типа опухолевых клеток, поскольку SK-MEL 28, MDA-MB-468 и CORL23 индуцировали большую активацию РВМС, чем клетки A549 или HT-26. Однако, независимо от опухолевых клеток, последующее добавление нефукозилированного mAb SEA-TGT, обладающего усиленной эффекторной функцией, к совместным культурам приводило к дальнейшему усилению активации иммунных клеток по всем направлениям. Для клеточных линий, где одной совместной инкубации с мертвыми клетками было недостаточно для существенной активации, включение нефукозилированного mAb TIGIT SEA-TGT показало наиболее существенное увеличение, демонстрирующее его сильную активирующую способность. В этих клетках основное антитело IgG1 TIGIT было способно вызывать некоторую активацию иммунных клеток, но оно было сильно подавлено по сравнению с усиленным mAb. LALA-версия анти-TIGIT, которая не обладает способностью связывать Fc γ R, была неактивна в отношении какой-либо иммунной активации.

Пример 18: Синергический эффект при сочетании нефукозилированного антитела TIGIT и ADC на основе ауристатина

18.1 Материалы и методы

18.1.1 In vitro оценка антитела TIGIT и ADC на основе ауристатина

[00468] Клетки немелкоклеточной карциномы легкого A549 индуцировали для гибели с помощью ICD-индуцирующего агента vc-MMAE, конъюгированного с антителом, нацеленным на опухолевые клетки, в концентрации EC₅₀. Клетки инкубировали с агентом в течение 18 часов, а затем добавляли к РВМС человека вместе с различными концентрациями (1, 0,1, 0,01 мкг/мл) антител к TIGIT с различными остовами Fc, включая антитела к TIGIT LALA, SEA-TGT и антитело 31C6 H4/L1, которое представляет собой антитело IgG1 (US 2018/0066055 A1). Затем оценивали иммунную активацию путем измерения уровней цитокинов (IP10) через 48 часов после совместного культивирования.

18.1.2 Оценка in vivo антитела TIGIT и ADC на основе ауристатина

[00469] Мышам Balb/c имплантировали сингенную линию опухолевых клеток CT26, которая экспрессирует опухолевый антиген Thy1.1, подкожно в бок в день 0. Когда средний размер опухоли (измеряемый по формуле Объем (мм³)=0,5 * длина * ширина², где длина - большее измерение) достигал 100 мм³, мышей рандомизировали в лечебные группы по 5 мышей в группе. Затем животных обрабатывали указанными препаратами внутривенно; каждую обработку проводили один раз каждые три дня, всего три обработки. Исходные концентрации антител разводили до соответствующей концентрации и вводили животным в объеме 100 мкл. Окончательные дозы составляли 0,1 мг/кг для SEA-TGT mIgG2a и 5 мг/кг для нацеленного на опухоль ADC vc-MMAE Thy1.1. Оба использованных антитела были на каркасах mIgG2a, и SEA-TGT mIgG2a не является фукозилированным. Длину опухоли, ширину опухоли и массу мыши измеряли на протяжении всего исследования, а объем опухоли рассчитывали по приведенной выше

формуле. За животными наблюдали до тех пор, пока не измеряли объем опухоли, пока он не достигал $\sim 1000 \text{ мм}^3$, после чего животных подвергали эвтаназии.

[00470] Мышам Balb/c имплантировали сингенную линию опухолевых клеток Rensa, которая экспрессирует опухолевый антиген EphA2, подкожно в бок в день 0. Когда средний размер опухоли (измеряемый по формуле $\text{Объем (мм}^3\text{)} = 0,5 * \text{длина} * \text{ширина}^2$, где длина - большее измерение) достигал 100 мм^3 , мышей рандомизировали в лечебные группы по 5 мышей в группе. Затем животных обрабатывали указанными препаратами внутривенно; каждую обработку проводили один раз каждые три дня, всего три обработки. Исходные концентрации антител разводили до соответствующей концентрации и вводили животным в объеме 100 мкл. Окончательные дозы составляли 0,1 мг/кг для SEA-TGT и 1 мг/кг для нацеленного на опухоль ADC vs-MMAE EphA2. Оба использованных антитела были на каркасах mIgG2a. Длину опухоли, ширину опухоли и массу мышцы измеряли на протяжении всего исследования, а объем опухоли рассчитывали по приведенной выше формуле. За животными наблюдали до тех пор, пока не измеряли объем опухоли, пока он не достигал $\sim 1000 \text{ мм}^3$, после чего животных подвергали эвтаназии.

18.2 Результаты

[00471] Как показано на ФИГ. 18А, инкубация ADC, убитых опухолевых клеток, с иммунной популяцией клеток, что приводит к некоторой активации иммунных клеток из-за иммуногенной гибели клеток, индуцированной посредством MMAE, что измеряется индукцией цитокина IP10 (см. столбцы по оси X, отмеченные цифрой «0»). Кроме того, добавление возрастающих концентраций SEA-TGT к совместной культуре приводило к существенному увеличению индукции этого цитокина. Этого не наблюдалось ни с эффекторно нулевым антителом к TIGIT (LALA), ни со стандартным антителом к TIGIT IgG1 (31C6 H4/L1), показывая, что нефукозилированный каркас SEA-TGT обеспечивает синергизм с иммуногенным MMAE, вызывающим гибель клеток, для обеспечения превосходной активации иммунных клеток.

[00472] Как показано на ФИГ. 18В и ФИГ. 18С, обработка модели опухоли CT26 и модели опухоли Rensa, соответственно, субтерапевтической дозой 0,1 мг/кг SEA-TGT приводила к уменьшению роста опухоли и задержке роста опухоли. ADC vs-MMAE (ведотин) сам по себе показал легкую задержку роста опухоли. Когда два агента вводили животным в тандеме, наблюдалось существенное снижение роста опухоли, а также лечебный ответ у 40% животных. Эти данные демонстрируют синергетический эффект при объединении антитела SEA-TGT mIgG2a (антитела SEA-TGT, преобразованного в нефукозилированный мышинный IgG2a, который соответствует нефукозилированному каркасу IgG1 человека) с его усиленной эффекторной функцией, с ADC, который индуцирует иммуногенную гибель клеток.

[00473] Тот факт, что такие наблюдения были сделаны на двух разных моделях опухолей с ADC, нацеленными на два разных антигена опухолевых клеток, предполагает, что противоопухолевая активность этой комбинации может быть широко применима к разным типам опухолей.

Пример 19: Синергический эффект при сочетании нефукозилированного антитела TIGIT и другого ADC на основе ауристинина

19.1 Материалы и методы

[00474] Клетки Rensa, сконструированные для экспрессии мышиного B7H4, имплантировали подкожно мышам Balb/c. Опухоли давали вырасти до 100 мм³, после чего мышам вводили субтерапевтические дозы SEA-TGT и SGN-B7H4 MMAE ADC (B7H4V) или субтерапевтическую дозу SEA-TGT и терапевтическую дозой оксалиплатина. Соединения давали в тот же день, и мышей лечили в общей сложности 3 дозами с интервалом в 7 дней.

19.2 Результаты

[00475] Как показано на ФИГ. 19, комбинаторная активность SEA-TGT распространялась на повышенную противоопухолевую активность, когда субтерапевтическую дозу SEA-TGT комбинировали с субтерапевтической дозой B7H4V. Комбинаторная активность SEA-TGT (субтерапевтическая доза) и B7H4V (субтерапевтическая доза) была аналогична комбинаторной активности SEA-TGT (субтерапевтическая доза) и оксалиплатина (терапевтическая доза), известного индуктора ICD. Оксалиплатин, однако, связан с предупреждениями об анафилаксии и почечной токсичности, и при назначении в терапевтической дозе сам по себе не очень активен и часто используется в сочетании с множеством других химиотерапевтических средств.

[00476] Также, как показано на ФИГ. 19, лечебный эффект SEA-TGT значительно усиливался при его сочетании с B7H4V. Хотя это и не связано с какой-либо теорией, считается, что этот эффект обусловлен индукцией ICD и долгоживущей реакцией Т-клеток памяти, которая индуцируется такой комбинацией (см. также пример 23 ниже).

[00477] Таким образом, результаты этого эксперимента согласуются с другими результатами, описанными в данном документе, показывая, что нефукозилированное антитело, направленное против активатора иммунных клеток (в этом эксперименте, нефукозилированное антитело к TIGIT, такое как SEA-TGT), хорошо сочетается с агентом, который индуцирует гибель иммунных клеток, которым в данном конкретном примере были как ADC MMAE (т.е. B7H4V), так и оксалиплатин. Однако комбинация с ADC MMAE предпочтительнее из-за токсичности, связанной с оксалиплатином, и потому, что сопоставимые терапевтические эффекты наблюдались при субтерапевтической дозе ADC по сравнению с терапевтической дозой оксалиплатина.

Пример 20: Синергический эффект при сочетании нефукозилированного антитела SEA-CD70 и ADC на основе ауристинина

[00478] SEA-CD70 (SEA-h1F6) представляет собой нефукозилированное антитело, нацеленное на антиген CD70. Молекула CD70 является членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF) (TNFSF) и связывается с родственным рецептором CD27 (TNFRSF7). Взаимодействие между двумя молекулами активирует внутриклеточные сигналы от обоих рецепторов. В нормальных условиях экспрессия CD70 носит временный характер и ограничивается активированными Т- и В-клетками, зрелыми дендритными

клетками и естественными киллерами (NK). Точно так же CD27 экспрессируется как на наивных, так и на активированных эффекторных Т-клетках, а также на NK и активированных В-клетках. Однако CD70 также aberrantly экспрессируется при различных гематологических раковых заболеваниях, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) и неходжкинскую лимфому (НХЛ), а также карциномы, и играет роль как в выживании опухолевых клеток, так и в /или уклонение опухоли от иммунного ответа. SEA-CD70 (который содержит VH и VL SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно, и CDR SEQ ID NO: 53-58) действует посредством блокирования передачи сигналов по оси CD70/CD27, вызывая антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC) и усиление антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Как описано ниже, SEA-CD70 тестировали в комбинации с брентуксимабом ведотином (BV, SGN-35, сAC10-MMAE) на модели подкожной НХЛ. Brentuximab vedotin, также называемый SGN-35, представляет собой ADC, нацеленный на CD30, содержащий MMAE, конъюгированный с моноклональным антителом сAC10. CD30 экспрессируется при лимфоме Ходжкина, а также у части пациентов с НХЛ.

20.1 Материалы и методы

In vivo оценка роста подкожной опухоли в модели ксенотрансплантата НХЛ

[00479] Клетки Farage ($2,5 \times 10^6$ клеток/животное) ресуспендировали в 0,1 мл 25% матригеля и вводили подкожно мышам SCID, которые содержат активные эффекторные клетки врожденного иммунитета для опосредования ADCP и ADCC. Когда средний размер опухоли достигал 100 мм^3 (измеряется по формуле: объем (мм^3) = $0,5 \cdot \text{длина} \cdot \text{ширина}^2$, где длина представляет собой больший размер), мышей случайным образом распределяли на группы обработки по 6 мышей в группе. Исследуемое средство вводили внутрибрюшинно. Исходные концентрации антитела и химиопрепарата разводили до соответствующей концентрации и вводили животным в дозе 10 мкл/г массы тела. Длину и ширину опухоли, а также массу животного измеряли по меньшей мере два раза в неделю на протяжении всего исследования. Через девятнадцать дней после имплантации дозирование начинали с 3 мг/кг SEA-CD70 и/или 1 мг/кг SGN-35. SEA-CD70 вводили внутрибрюшинно (в/б) каждые 4 дня 5 раз, а SGN-35 вводили однократно в/б на 19-й день. За животными наблюдали до тех пор, пока объем опухоли не превышал 500 мм^3 , после чего животных подвергали эвтаназии. Конечная точка размера опухоли 500 мм^3 была выбрана из-за склонности опухолей к изъязвлению при большем размере.

20.2 Результаты

[00480] Как показано на ФИГ. 20А, комбинация SGN-35 и SEA-CD70 задерживает рост опухоли по сравнению с лечением одним агентом SGN-35 или SEA-CD70. Все нелеченные опухоли увеличились в объеме более чем в 5 раз по сравнению с первоначальным размером к 28,5 дню (через 9,5 дней после лечения), в то время как опухоли, обработанные одним агентом SEA-CD70 или одним агентом SGN-35, достигли среднего 5-кратного увеличения на 34,5 и 46 день соответственно (15,5 и 27 дней после обработки). Примечательно, что ни одна из опухолей, обработанных комбинацией SEA-

CD70 и SGN-35, не достигла установленного конечного размера к моменту завершения эксперимента (50-й день) (ФИГ. 20B). По сравнению с однократной обработкой SEA-CD70 или SGN-35 при комбинировании SEA-CD70 и SGN-35 не наблюдалось явной токсичности или дополнительной потери массы. Эти данные показали, что комбинация ADC, несущего полезную нагрузку MMAE (SGN-35), и нефукозилированного антитела (SEA-CD70) эффективна и хорошо переносится.

Пример 21: Синергетический эффект от комбинации нефукозилированного антитела SEA-BCMA и ADC ауристатина

[00481] SEA-BCMA представляет собой нефукозилированное антитело, нацеленное на антиген созревания В-клеток (BCMA), который экспрессируется при множественной миеломе (MM). SEA-BCMA (который имеет VH и VL SEQ ID NO: 45 и 46, соответственно, и CDR SEQ ID NO: 47-52) действует посредством блокирования опосредованной лигандом передачи сигналов клетками BCMA, антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и усиленной антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Как описано ниже, SEA-BCMA тестировали в комбинации с SGN-CD48A на моделях ксенотрансплантата диссеминированной опухоли MM. SGN-CD48A представляет собой ADC, нацеленный на CD48, содержащий MMAE, связанный с глюкурономидом. CD48 широко экспрессируется в MM.

21.1 Материалы и методы

21.1.1 Оценка выживаемости модели ксенотрансплантата in vivo

[00482] Клетки MM MM1S вводили внутривенно животным SCID, которые содержат активные эффекторные клетки врожденного иммунитета для опосредования ADCP и ADCC. Через семь дней после имплантации начинали введение 0,1 мг/кг SEA-BCMA и/или 0,01 мг/кг SGN-CD48A, и животных контролировали на выживаемость. SEA-BCMA вводили еженедельно в течение 5 недель внутрибрюшинно, а SGN-CD48A вводили однократно внутрибрюшинно. За животными наблюдали в течение 160 дней для выживания (N=8/группа). К 51 дню все необработанные животные были гуманно усыплены в соответствии с протоколами IACUC.

21.1.2 Оценка люциферазы модели ксенотрансплантата in vivo

[00483] Клетки MM люциферазы L363 вводили внутривенно животным с SCID, и клетки MM позволяли вернуться в костный мозг. Сигнал люциферазы отслеживали во времени. Через тридцать дней после имплантации начинали введение 3 мг/кг SEA-BCMA и/или 0,3 мг/кг SGN-CD48A. SEA-BCMA вводили еженедельно в течение 5 недель внутрибрюшинно, а SGN-CD48A вводили однократно внутрибрюшинно. За животными наблюдали в течение 175 дней (N=5/группа). К 58 дню все необработанные животные были гуманно усыплены в соответствии с протоколами IACUC.

21.2 Результаты

[00484] Как показано на ФИГ. 21A-B, SGN-CD48A в сочетании с SEA-BCMA индуцирует полные ремиссии и продлевает выживаемость в тестируемых моделях мышей. На ФИГ. 21A, к 160 дню пять из восьми животных оставались живыми в группе,

получавшей комбинированную терапию, по сравнению с нулем животных, получавших только SEA-BCMA, и одним животным, получавшим только SGN-CD8A. На ФИГ. 21B, к 37-му дню у всех животных, получавших комбинированную терапию, не обнаруживался сигнал люциферазы, который оставался отсутствующим до конца исследования, на 175-й день. Эта поразительная синергия может быть связана с уникальной комбинацией ICD, индуцирующей ADC ауристатина, с клетками врожденного иммунитета, взаимодействующими с SEA-BCMA.

Пример 22: ADC ведотина индуцирует рекрутирование и активацию иммунных клеток *in vivo*

22.1 Материалы и методы

[00485] Опухолевые ксенотрансплантаты выделяли у животных, получавших ADC vc-MMAE или несвязывающий vc-MMAE изотип ADC в течение 8 дней, и подвергали проточной цитометрии или профилированию цитокинов. CD45-положительные иммунные клетки окрашивали на CD11c, и активацию наблюдали путем окрашивания экспрессии MHC-класса II на клеточной поверхности. Внутриопухолевые цитокины измеряли с помощью Luminesx.

22.2 Результаты

[00486] Как показано на ФИГ. 22, у мышей с опухолями, получавших ADC на основе MMAE, нацеленных на общий опухолевый антиген (ADC vc-MMAE), наблюдалось стимулирование рекрутирования и активация иммунных клеток в опухолях. Инфильтрация дендритных клеток и антиген-презентация дендритных клеток были значительно усилены при обработке ADC на основе MMAE, нацеленными на опухоли (ADC vcMMAE), по сравнению с несвязывающим контролем (несвязывающим ADC) (ФИГ. 22B). Внутриопухолевые уровни цитокинов также были значительно повышены при обработке ADC на основе MMAE, нацеленными на опухоли (ADC vc-MMAE) (ФИГ. 22C). Эти данные свидетельствуют о том, что ADC, содержащие разрушитель тубулина, вызывают стресс ЭПР и гибель опухолевых клеток таким образом, что это приводит к стимулированию рекрутирования и активации иммунных клеток в опухолях.

[00487] Эти результаты свидетельствуют о том, что ADC на основе MMAE являются предпочтительными партнерами для агентов, блокирующих иммунные контрольные точки.

Пример 23. Индукция Т-клеточной памяти с помощью ADC ведотина.

23.1 Материалы и методы

[00488] Мышам Balb/c подкожно имплантировали сингенные опухолевые клетки Rensa, которые экспрессируют опухолевый антиген EphA2, в бок на день 0. Когда средний размер опухоли (измеряемый по формуле Объем (мм³)=0,5 * длина * ширина², где длина - большее измерение) достигал 100 мм³, мышей рандомизировали в лечебные группы по 5 мышей в группе. Затем животным вводили указанные препараты внутривентриально (фиг. 21A). Каждое введение проводилось один раз. Исходные концентрации антител разводили до соответствующей концентрации и вводили животным в объеме 100 мкл. Конечные дозы составляли 5 мг/кг для ADC, нацеленных на опухоль (ADC-vcMMAE), и несвязывающих

ADC (изотип-vcMMAE, также известного как h00-vcMMAE). Длину опухоли, ширину опухоли и массу мышцы измеряли на протяжении всего исследования, а объем опухоли рассчитывали по приведенной выше формуле. За животными наблюдали до тех пор, пока объем опухоли не достигал $\sim 1000 \text{ мм}^3$, после чего животных подвергали эвтаназии.

[00489] Наблюдали за мышами, достигшими излечивающего противоопухолевого ответа. Затем, через 30 дней после достижения излечения, мышам повторно вводили опухолевые клетки Rensa (ФИГ. 21В) и оценивали рост и отторжение новых опухолей.

23.2 Результаты

[00490] Как показано на ФИГ. 23А, в сингенной модели Rensa обработка однократной дозой ADC MMAE, нацеленных на опухоль (ADC-vcMMAE), приводило к сильной противоопухолевой активности и лечебным реакциям. Как показано на ФИГ. 23В, когда мышам, излеченным с помощью обработки MMAE ADC, повторно вводили опухолевые клетки Rensa для оценки индукции иммунной памяти, такие мыши были способны отторгать впоследствии имплантированные опухолевые клетки. Такие результаты демонстрируют способность ADC MMAE вызывать специфический противоопухолевый Т-клеточный ответ.

Пример 24. Клетки, обработанные брентуксимабом ведотином (BV; SGN-35), придают защитный противоопухолевый иммунитет

24.1 Материалы и методы

[00491] Клетки A20, экспрессирующие CD30 человека, обрабатывали ADC CD30-ауристатин (BV; SGN-35) или MMAE в течение 18 часов. Альтернативно, одну аликвоту клеток подвергали мгновенной заморозке. Для удаления живых клеток проводили центрифугирование с фиколлом обработанных образцов. Все образцы анализировали на апоптоз и жизнеспособность с помощью проточной цитометрии с использованием аннексина V/7AAD. Погибшие и мертвые клетки промывали, ресуспендировали в PBS и вводили мышам внутрибрюшинно. Мышей иммунизировали 2 раза с интервалом 7 дней. Иммунизированные мыши отдыхали в течение 7 дополнительных дней, а затем их заражали клетками лимфомы A20, и с течением времени наблюдали за ростом или отторжением опухоли.

24.2 Результаты

[00492] Как показано на ФИГ. 24, мыши, иммунизированные CD30-экспрессирующими клетками A20, которые были убиты с помощью BV или MMAE, демонстрировали более сильный иммунный ответ, отторгающий имплантированные клетки A20, по сравнению с мышами, иммунизированными CD30-экспрессирующими клетками A20, которые были убиты с помощью мгновенного замораживания, метода гибели клеток, отличного от ICD. Эти результаты указывают на индукцию ответа Т-клеток памяти. Индукция иммунологической памяти считается золотым стандартом для оценки ICD-активности молекулы.

[00493] В совокупности результаты, представленные в приведенных выше примерах, подтверждают уникальную способность ADC на основе ауристатина (например,

ММАЕ и ММАФ) индуцировать иммуногенную гибель клеток. Как показано в приведенных выше примерах, механизм действия ауристатинов и их способность разрушать сети микротрубочек, по-видимому, связаны с индукцией стрессовых реакций ЭПР, что приводит к экспонированию и секреции сигналов опасности (DAMP). Воздействие этих DAMP инициирует ответ врожденных иммунных клеток, который может привести к антиген-специфичному Т-клеточному ответу. Индукция новых антиген-специфических Т-клеток, которые могут распознавать опухолевые антигены, может привести к лечебной противоопухолевой активности доклинически, что связано с ответами Т-клеток долговременной памяти, которые обеспечивают долговременную иммунную защиту.

[00494] Эта популяция Т-клеток памяти, которые индуцируются ADC ММАЕ, может быть дополнительно увеличена и/или усилена нефукозилированными антителами. После установления иммунологической памяти (например, посредством описанных выше ответов Т-клеток памяти), возникающих в результате индуцированного ADC ММАЕ ICD, нефукозилированные антитела, такие как SEA-TIGIT, могут дополнительно усиливать иммунные ответы посредством механизмов блокирования/ингибирования опухоли, аналогичных механизмам ингибирования контрольных точек PD-1/PD-L1.

[00495] Кроме того, сочетание способности ADC на основе ауристатина (например, ММАЕ и ММАФ), таких как ADC ММАЕ, вызывать иммуногенную гибель клеток с агонизмом иммунных клеток, может усиливать противоопухолевую активность. Иммунный агонизм можно усилить за счет использования нефукозилированных антител или антител, которые были сконструированы таким образом, чтобы повышать связывание с активирующими FcγR и/или снижать связывание с ингибирующими FcγR (например, как показано в приведенных выше примерах с нефукозилированными антителами к CD40 и ВСМА). Нефукозилированные антитела могут иметь повышенное связывание с активирующим рецептором FcγRIIIa и пониженное или минимальное связывание с ингибирующим рецептором FcγRIIb. Этот атрибут мультимодальный, в зависимости от природы мишени антитела. В случае рецепторов, таких как CD40, которые оптимально активны при кластеризации, связывание нефукозилированных антител с клетками FcγRIIIa⁺ увеличивает кластеризацию рецепторов, а также иммунный агонизм и активацию. См ФИГ. 25. Как и в случае TIGIT, нефукозилированные антитела увеличивают силу иммунного синапса между антигенными (+) Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками (ФИГ. 25). Взаимодействие FcγRIIIa с врожденными клетками увеличивает их активацию и выработку факторов, которые могут усиливать антигенспецифический Т-клеточный ответ. Наконец, нефукозилированный каркас может, независимо от антигена-мишени, связываться с врожденными иммунными клетками или другими клетками FcγRIIIa, такими как гамма-дельта Т-клетки, чтобы индуцировать активированное состояние, которое может помочь вызвать вторичный антигенспецифический Т-клеточный ответ. Все эти механизмы, с помощью которых работают нефукозилированные антитела, могут привести к Т-клеточному ответу, который обеспечивает противоопухолевую активность и долговременную иммунную защиту. Снижение или отсутствие связывания с

FcyRIIIb означает отсутствие встречных или ингибирующих сигналов, которые снижают иммунную активацию, вызванную нефукозилированными антителами.

[00496] Механизм действия ADC ауристатина, таких как ADC MMAE, в сочетании с иммуномодуляцией нефукозилированными mAb приводит к синергической и комплементарной активности, которая, как было показано, приводит к усиленной иммунной активации и лечебному противоопухолевому ответу, как показано в данном документе.

[00497] Все публикации, патенты, патентные заявки или другие документы, процитированные в данном документе, настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были индивидуально указаны для включения посредством ссылки для всех целей.

Таблица последовательностей

Название	SEQ ID NO	Последовательность
Белок VH клона 13 антитела к TIGIT	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGSIPIFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGP SEVGAILGYVWFDPPWGQGTLLTVSS
Белок VH клона 13A антитела к TIGIT	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSA ISWVRQAPGQGLEWMGSLIPYFGTANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR GPSEVGAILGYVWFDPPWGQGTLLTVSS
Белок VH клона 13B антитела к TIGIT	3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAW AISWVRQAPGQGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR GPSEVSGILGYVWFDPPWGQGTLLTVSS
Белок VH клона 13C антитела к TIGIT	4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSA ISWVRQAPGQGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGP SEVKGILGYVWFDPPWGQGTLLTVSS
Белок VH клона 13D антитела к TIGIT	5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFLSSA ISWVRQAPGQGLEWMGSIIPYFGKANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGP SEVKGILGYVWFDPPWGQGTLLTVSS
Белок VL клонов 13,	6	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGY

13A, 13B, 13C и 13D		NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARRIPIT FGGGTKVEIK
CDR1 VH клона 13	7	GTFSSYAIS
CDR1 VH клонов 13A, 13C и 13D	8	GTFLLSSAIS
CDR1 VH клона 13B	9	GTFSAWAIS
CDR2 VH клона 13	10	SIIPIFGTANYAQKFQG
CDR2 VH клона 13A	11	SLIPYFGTANYAQKFQG
CDR2 VH клонов 13B и 13D	12	SIIPYFGKANYAQKFQG
CDR2 VH клона 13C	13	SIIPFLGKANYAQKFQG
CDR3 VH клонов 13 и 13A	14	ARGPSEVGAILGYVWFDP
CDR3 VH клона 13B	15	ARGPSEVSGILGYVWFDP
CDR3 VH клонов 13C и 13D	16	ARGPSEVKGILGYVWFDP
CDR1 VL клонов 13, 13A, 13B, 13C и 13D	17	RSSQSLLSHNGYNYLD
CDR2 VL клонов 13, 13A, 13B, 13C и 13D	18	LGSNRAS
CDR3 VL клонов 13, 13A, 13B, 13C и 13D	19	MQARRIPIT
Аминокислотная последовательность тяжелой цепи hIgG1 клона 13 (и нефукозилированного hIgG1); жирным шрифтом обозначена VH; SEA-TGT	20	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSS Y AISWVRQAPGQGLEWMG S IIPIFGTANYAQ K FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED T AVY Y CARGPSEVGAILGYVWFDPWGQ G TLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK K VEPKS CDK T HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK P KDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTK P REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK T ISKAKGQPREPQVY T LP

		PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность тяжелой цепи hIgG1 клона 13А (и нефукозилированного hIgG1); жирным шрифтом обозначена VH	21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFLSS AISWVRQAPGQGLEWMGSLIPYFGTANYA QK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность тяжелой цепи hIgG1 клона 13В (и нефукозилированного hIgG1); жирным шрифтом обозначена VH	22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSA WAISWVRQAPGQGLEWMGSIIPYFGKANYA Q KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGPSEVSGILGYVWFDPWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность тяжелой цепи hIgG1 клона 13С (и	23	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFLSS AISWVRQAPGQGLEWMGSIIP LF GKANYA QK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGPSEVKGILGYVWFDPWGQGTLVTVSSA

нефукозилированного hIgG1); жирным шрифтом обозначена VH		<p>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQLVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Аминокислотная последовательность тяжелой цепи hIgG1 клона 13D (и нефукозилированного hIgG1); жирным шрифтом обозначена VH	24	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFLSS AISWVRQAPGQGLEWMGSIIPYFGKANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGPSEVKGILGYVWFDPWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQLVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Аминокислотная последовательность легкой цепи hкаппа (и нефукозилированной) клонов 13, 13A, 13B, 13C и 13D; жирным шрифтом обозначена VL; SEA-TGT	25	<p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSN GYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ ARRIPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
Тяжелая цепь SEA-CD40 (нефукозилированная)	26	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYI HWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKG RFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</p>

hS2C6)		EGIYWWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
Легкая цепь SEA- CD40 (нефукозилированная hS2C6)	27	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNG NTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
VH SEA-CD40	28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYI HWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKG RFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EGIYWWGQGTLVTVSS
VL SEA-CD40	29	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNG NTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTF GQGTKVEIK
CDR1 VH SEA-CD40	30	GYYIH
CDR2 VH SEA-CD40	31	RVIPNAGGTSYNQKFKG
CDR3 VH SEA-CD40	32	EGIYW
CDR1 VL SEA-CD40	33	RSSQSLVHSNGNTFLH
CDR2 VL SEA-CD40	34	TVSNRFS
CDR3 VL SEA-CD40	35	SQTTHVPWT
CDR2 альтернативного	36	RVIPQAGGTSYNQKFKG

антитела к CD40		
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-B6A	37	QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYN VNWVRQAPGQGLEWIGVINPKYGTTRYNQKFK GRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCTR GLNAWDYWGGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SGN-B6A	38	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCGASENIYGALN WYQQKPGKAPKLLIYGATNLEDGVPSRFSGSGS GRDYTFTISLQPEDIAITYYCQNVLTTPYTFGQG TKLEIK
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-STNV	39	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDH AIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPGND DIKYNEKF RGRVTMTADKSSSTAYMELRSLRSDDТАVYFCK RSLSTPYWGQGTЛVTVSS
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-STNV	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNRRGN HKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP YTFGQGTKVEIK
Вариабельная область тяжелой цепи SEA-CD70	41	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNY GMNWRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADA FKGRVTMTRDTSISTAYMELSRSLRSDDТАVYYC ARDYGDYGMDYWGGTTVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SEA-CD70	42	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGY SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPW TFGQGTKVEIK
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-CD228A	43	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKLEYIG SLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSVTAADТАVYYCARRTLATYYAMDYW
Вариабельная область легкой цепи SGN-CD228A	44	DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSDGNLYLHWYQQRPGQS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCSQSTHVPPYTFGQGTK
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-BCMA	45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTDY YIHWVRQAPGQGLEWIGYINPNSGYTNYAQKFK GRATMTADK SINTAYVELSRSLRSDDТАVYFCTR

		YMWERTGFFDFWGQGMVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SGN-BCMA	46	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDISDDLA WYQQKPGKAPKVLVYTTSSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQTYKFPPTFGGGT KVEIK
CDR1 VH SGN-BCMA	47	DYYIH
CDR2 VH SGN-BCMA	48	YINPNSGYTNYAQKFQG
CDR3 VH SGN-BCMA	49	YMWERTGFFDF
CDR1 VL SGN-BCMA	50	LASEDISDDLA
CDR2 VL SGN-BCMA	51	TTSSLQS
CDR3 VL SGN-BCMA	52	QQTYKFPPT
CDR1 VH SEA-CD70	53	NYGMN
CDR2 VH SEA-CD70	54	WINTYTGEPTYADAFKG
CDR3 VH SEA-CD70	55	DYGDYGM DY
CDR1 VL SEA-CD70	56	RASKSVSTSGYSFMH
CDR2 VL SEA-CD70	57	LASNLES
CDR3 VL SEA-CD70	58	QHSREVPWT
Вариабельная область тяжелой цепи золбетуксимаба (175D10)	59	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYW INWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKD KATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRS WRGNSFDYWGQGTTLTVSS
Вариабельная область легкой цепи золбетуксимаба (175D10)	60	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGN QKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYP FTFGSGTK
CDR1 VH золбетуксимаба (175D10)	61	SYWIN
CDR2 VH золбетуксимаба (175D10)	62	NIYPSDSYTNYNQKFKD

CDR3 VH золбетуксимаба (175D10)	63	SWRGNSFDY
CDR1 VL золбетуксимаба (175D10)	64	KSSQSLLNSGNQKNYLT
CDR2 VL золбетуксимаба (175D10)	65	WASTRES
CDR3 VL золбетуксимаба (175D10)	66	QNDYSYPFT
Вариабельная область тяжелой цепи 163E12	67	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGM NWVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFK GRFAFSLETSASTAYLQINNKNEDTATYFCARL GFGNAMDYWGQGTSTVTVSS
Вариабельная область легкой цепи 163E12	68	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGN QKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYP LTFGAGTKLELK
CDR1 VH 163E12	69	NYGMN
CDR2 VH 163E12	70	WINTNTGEPTYAEEFKG
CDR3 VH 163E12	71	LGFGNAMDY
CDR1 VL 163E12	72	KSSQSLLNSGNQKNYLT
CDR2 VL 163E12	73	WASTRES
CDR3 VL 163E12	74	QNDYSYPLT
Вариабельная область тяжелой цепи SGN- PDL1V	75	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSKSTGDTFSTAA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKF HFVSGSPFGMDVWGQGTSTVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SGN- PDL1V	76	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGT KVEIK

CDR1 VH SGN-PDL1V	77	TAAIS
CDR2 VH SGN-PDL1V	78	GIPIFGKAHYAQKFQG
CDR3 VH SGN-PDL1V	79	KFHFVSGSPFGMDV
CDR1 VL SGN-PDL1V	80	RASQSVSSYLA
CDR2 VL SGN-PDL1V	81	DASNRAT
CDR3 VL SGN-PDL1V	82	QQRSNWPT
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-ALPV	83	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYY MSWVRQAPGKGLEWLALIRNKATGYTTEYTAS VKGRFTISRDNKSKILYLQMNLSLKTEDTAVYYC ARAFYYDGKVLAYWGQGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SGN-ALPV	84	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDINKYLA WYQYKPGKAPKLLIHYTSSLQSGVPSRFSGSGSG RDYFTFTISLQPEDATYYCLQYDNLYTFGGQGTK LEIK
CDR1 VH SGN-ALPV	85	DYYMS
CDR2 VH SGN-ALPV	86	LIRNKATGYTTEYTASVKG
CDR3 VH SGN-ALPV	87	ASFYYDGKVLAY
CDR1 VL SGN-ALPV	88	QASQDINKYLA
CDR2 VL SGN-ALPV	89	YTSSLQS
CDR3 VL SGN-ALPV	90	LQYDNLYT
Вариабельная область тяжелой цепи SGN-B7H4V	91	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSGSY YWGWRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLRS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE GSYPNQFDPWGQGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SGN-B7H4V	92	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYHSFPFTFGGGT KVEIK

CDR1 VH SGN-B7H4V	93	GSIKSGSYYWG
CDR2 VH SGN-B7H4V	94	NIYYSGSTYYNPSLRS
CDR3 VH SGN-B7H4V	95	AREGSYPNQFDP
CDR1 VL SGN-B7H4V	96	RASQSVSSNLA
CDR2 VL SGN-B7H4V	97	GASTRAT
CDR3 VL SGN-B7H4V	98	QQYHSFPFT
Тяжелая цепь диситамаб ведотина	99	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYY IHWVQQAPGKGLEWMGRVNPDHGDSYYNQKF KDKATITADKSTDATAYMELSSLRSEDNAVYFCA RNYLFDHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
Легкая цепь диситамаб ведотина	100	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQDVGTA AWYQQKPGKAPKLLIYWASIRHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQFATYTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
Тяжелая цепь	101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFA

лифастузумаб ведотина		MSWVRQAPGKGLEWVATIGRVAFHYYPPDSMK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR HRGFDVGHFDFWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Легкая цепь лифастузумаб ведотина	102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSETLVHSSGN TYLEWYQQKPGKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNPLTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
Вариабельная область тяжелой цепи энфортумаб ведотина (EV)	103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYN MNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKG RFTISRDN AKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARA YYYGMDVWGQGTITVTVSS
Вариабельная область легкой цепи энфортумаб ведотина (EV)	104	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLA WYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGG TKVEIK
CDR1 VH энфортумаб ведотина (EV)	105	SYNMN
CDR2 VH энфортумаб ведотина (EV)	106	YISSSSSTIYYADSVKG
CDR3 VH энфортумаб ведотина (EV)	107	AYYYGMDV

CDR1 VL энфортумаб ведотина (EV)	108	RASQGISGWL A
CDR2 VL энфортумаб ведотина (EV)	109	AASTLQS
CDR3 VL энфортумаб ведотина (EV)	110	QQANSFPPT
Вариабельная область тяжелой цепи h2A2	111	QFQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTDYN VNWVRQAPGQGLEWIGVINPKYGTTRYNQKFK GRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GLNAWDYWGQGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи h2A2	112	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCGASENIYGALN WYQQKPGKAPKLLIYGATNLEDGVPSRFSGSGS GRDYTFTISLQPED IATYYCQNVLTTPYTFGQG TKLEIK
CDR1 VH h2A2	113	DYNVN
CDR2 VH h2A2	114	VINPKYGTTRYNQKFKG
CDR3 VH h2A2	115	GLNAWDY
CDR1 VL h2A2	116	GASENIYGALN
CDR2 VL h2A2	117	GATNLED
CDR3 VL h2A2	118	QNVLTTPYT
Вариабельная область тяжелой цепи h15H3	119	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFSGYF MNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFYNQKF KGRVTMTRQTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCV RGLRRDFDYWGQGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи h15H3	120	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSLLDSG KTYLNWLFQRPGQSP RRLIYLVSELD SGVPDRFS GSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCWQGT HFPRT TFGGGTKLEIK
CDR1 VH h15H3	121	GYFMN
CDR2 VH h15H3	122	LINPYNGDSFYNQKFKG
CDR3 VH h15H3	123	GLRRDFDY
CDR1 VL h15H3	124	KSSQSLLDSGKTYLN
CDR2 VL h15H3	125	LVSELD S
CDR3 VL h15H3	126	WQGT HFPRT

Вариабельная область тяжелой цепи SGN-CD228A	127	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITSGYW NWIRQPPGKGGLEYIGYISDSGITYYNPSLKSRTI SRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARRLAT YYAMDYWGQGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи SGN-CD228A	128	DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSDG NTYLHWYQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPP TFGQGTKLEIK
CDR1 VH SGN-CD228A	129	SGYWN
CDR2 VH SGN-CD228A	130	YISDSGITYYNPSLKS
CDR3 VH SGN-CD228A	131	RLATYYAMDY
CDR1 VL SGN-CD228A	132	RASQSLVHSDGNTYLH
CDR2 VL SGN-CD228A	133	RVSNRFS
CDR3 VL SGN-CD228A	134	SQSTHVPT
Вариабельная область тяжелой цепи ладиратузумаб ведотина (LV) SGN-LIV1A	135	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGLTIEDYY MHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTTEYGPKF QGRVTMTRDTSINTAYMELSLRSDDTAVYYCA VHNAHYGTWFAYWGQGTLVTVSS
Вариабельная область легкой цепи ладиратузумаб ведотина (LV) SGN-LIV1A	136	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSG NTYLEWYQQRPGQSPRPLIYKISTRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPY TFGGGTKVEIK
CDR1 VH ладиратузумаб ведотина (LV) SGN-LIV1A	137	DYYMH

CDR2 VH ладиратузумаб ведотина (LV) SGN- LIV1A	138	WIDPENGDT EYGP KFQG
CDR3 VH ладиратузумаб ведотина (LV) SGN- LIV1A	139	HNAHYGTWFAY
CDR1 VL ладиратузумаб ведотина (LV) SGN- LIV1A	140	RSSQSL LHSSGNTYLE
CDR2 VL ладиратузумаб ведотина (LV) SGN- LIV1A	141	KISTRFS
CDR3 VL ладиратузумаб ведотина (LV) SGN- LIV1A	142	FQGSHPY T
Вариабельная область тяжелой цепи тизотумаб ведотина (TV)	143	EVQLLES GGGLVQP GGLRLSCAASGFTFSNYA MSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGDYTYTDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SPWGYYLDSWGQGT LVTVSS
Вариабельная область легкой цепи тизотумаб ведотина (TV)	144	DIQMTQSPPSL SASAGDRVTITCRASQGISSRLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGT KLEIK
CDR1 VH тизотумаб ведотина (TV)	145	GFTFSNYA
CDR2 VH тизотумаб ведотина (TV)	146	ISGSGDY T
CDR3 VH тизотумаб ведотина (TV)	147	ARSPWGYYLDS

CDR1 VL тизотумаб ведотина (TV)	148	QGISSR
CDR2 VL тизотумаб ведотина (TV)	149	AAS
CDR3 VL тизотумаб ведотина (TV)	150	QQYNSYPYT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с раком (1) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), который содержит первое антитело, которое связывает опухолеассоциированный антиген, и цитотоксический агент, причем цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина; и (2) второе антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, при этом второе антитело содержит Fc с повышенным связыванием с одним или более активирующими FcγR, при этом активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI.

2. Способ по п. 1, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa.

3. Способ по п. 1, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRIIa.

4. Способ по п. 1, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRI.

5. Способ по п. 1, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с FcγRIIIa, FcγRIIa и FcγRI.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR.

7. Способ по п. 6, где Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIIb.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где Fc второго антитела имеет пониженные уровни фукозы и/или был сконструирован таким образом, чтобы он содержал одну или более мутаций, в результате чего Fc имеет усиленное связывание с одним или более активирующими FcγR.

9. Способ по п. 8, где второе антитело является нефукозилированным.

10. Способ по п. 8, где второе антитело содержит замены S293D, A330L и I332E в константной области тяжелой цепи.

11. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с раком, конъюгата антитело-лекарственное средство, при этом конъюгат антитело-лекарственное средство содержит первое антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, при этом цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина; и второе антитело, которое связывает активатор иммунных клеток, при этом второе антитело является нефукозилированным.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где первое антитело связывает опухолеассоциированный антиген.

13. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с раком (1) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), причем ADC содержит первое антитело, которое связывает опухолеассоциированный антиген, и цитотоксический агент, причем цитотоксический агент представляет собой разрушитель тубулина и (2) второе антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток, при этом второе антитело содержит Fc с усиленной активностью ADCC по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того

же изотипа.

14. Способ по п. 13, где второе антитело содержит Fc с повышенной активностью ADCC и ADCP по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где второе антитело является нефукозилированным.

16. Способ по любому из пп. 13-15, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с одним или более активирующими FcγR, при этом активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI.

17. Способ по п. 16, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa.

18. Способ по п. 16, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRIIa.

19. Способ по п. 16, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием по меньшей мере с FcγRIIIa и FcγRI.

20. Способ по п. 16, где второе антитело содержит Fc с усиленным связыванием с FcγRIIIa, FcγRIIa и FcγRI.

21. Способ по любому из пп. 13-20, где Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR.

22. Способ по п. 21, где Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIb.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где первое антитело связывает антиген, выбранный из 5T4 (TPBG), ADAM-9, AG-7, ALK, ALP, AMHRII, APLP2, ASCT2, AVB6, AXL (UFO), B7-H3 (CD276), B7-H4, BCMA, C3a, C3b, C4.4a (LYPD3), C5, C5a, CA6, CA9, CanAg, карбоангидразы IX (CAIX), катепсина D, CCR7, CD1, CD10, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD111, CD112, CD113, CD116, CD117, CD118, CD119, CD11A, CD11b, CD11c, CD120a, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD13, CD130, CD131, CD132, CD133, CD135, CD136, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD146, CD147, CD148, CD15, CD150, CD151, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b2, CD158e, CD158f1, CD158h, CD158i, CD159a, CD16, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD166, CD167b, CD169, CD16a, CD16b, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD18, CD180, CD181, CD183, CD184, CD185, CD19, CD194, CD197, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD20, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD208, CD21, CD213a1, CD213a2, CD217, CD218a, CD22, CD220, CD221, CD222, CD224, CD226, CD228, CD229, CD23, CD230, CD232, CD239, CD243, CD244, CD248, CD249, CD25, CD26, CD265, CD267, CD269, CD27, CD272, CD273, CD274, CD275, CD279, CD28, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD289, CD29, CD294, CD295, CD298, CD3, CD3 эпсилон, CD30, CD300f, CD302, CD304, CD305, CD307, CD31, CD312, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD32, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD32b, CD33, CD331, CD332, CD333, CD334, CD337, CD339, CD34, CD340, CD344, CD35, CD352, CD36, CD37, CD38, CD39, CD3d, CD3g, CD4, CD41, CD42d, CD44, CD44v6, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD5, CD50, CD51, CD51 (интегрин альфа-

V), CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD6, CD61, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD66a-e, CD67, CD68, CD69, CD7, CD70, CD70L, CD71, CD71 (TfR), CD72, CD73, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD82, CD83, CD84, CD85f, CD85i, CD85j, CD86, CD87, CD89, CD90, CD91, CD92, CD95, CD96, CD97, CD98, CDH6, CDH6 (кадгерина 6), CDw210a, CDw210b, CEA, CEACAM5, CEACAM6, CFC1B, cKIT, CLDN18.2 (клаудин 18.2), CLDN6, CLDN9, CLL-1, c-MET, факторов комплемента C3, Cripto, CSP-1, CXCR5, DCLK1, DLK-1, DLL3, DPEP3, DR5 (рецептора смерти 5), дисадгерина, EFNA4, EGFR, EGFR дикого типа, EGFRviii, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, EMP2, ENPP3, EpCAM, EphA2, EphA3, эфрина-A4 (EFNA4), ETBR, FAP, FcRH5, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR, FOLR1, FOLR-альфа, FSH, GCC, GD2, GD3, globo H, GPC1, GPC-1, GPC3, GPNMB, GPR20, HER2, HER-2, HER3, HER-3, HGFR (c-Met), HLA-DR, HM1.24, HSP90, Ia, IGF-1R, IL-13R, IL-15, IL1RAP, IL-2, IL-3, IL-4, IL7R, интегрин альфаVбета 3 (интегрин $\alpha V\beta 3$), интегрин бета-6, рецептор интерлейкина-4 (IL4R), KAAG-1, KLK2, LAMP-1, Le(y), антигена Льюиса Y, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH, липидного рафта, LIV-1 (SLC39A6 или ZIP6), LRP-1, LRRC15, LY6E, рецептора маннозы макрофага 1, MAGE, мезотелина (MSLN), MET, белка A, родственного цепи МНС класса I, и B (MICA и MICB), MN/CA IX, MRC2, MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC1, MUC16, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC5ac, NaPi2b, NCA-90, NCA-95, нектин-4, Notch3, нуклеолина, OAcGD2, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), OX001L, P1GF, антигена PAM4, p-кадгерина (кадгерин 3), PD-L1, фосфатидилсерина (PS), PRLR, рецептора пролактина (PRLR), белков псевдомонад, PSMA, PTK4, PTK7, рецепторной тирозинкиназы (RTK), RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SEZ6, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, SLMAMF7 (CS1), SLTRK6, сортилина (SORT1), SSEA-4, SSTR2, Staphylococcus aureus (антибиотика), STEAP-1, STING, STn, T101, TAA, TAC, TDGF1, тенасцина, TENB2, TGF- β , антигенов Томсона - Фриденрайха, Thy1.1, TIM-1, тканевого фактора (TF; CD142), TM4SF1, антигена Tn, ФНО-альфа (ФНО α), TRA-1-60, рецептора TRAIL (R1 и R2), TROP-2, опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72), uPAR, VEGFR, VEGFR-2 и хСТ.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где первое антитело не связывает нектин-4.

25. Способ по любому из пп. 1-24, причем способ не включает введение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело, которое связывает нектин-4.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где первое антитело связывает антиген, выбранный из CD71, Ax1, AMHRII и LGR5, Ax1, CA9, CD142, CD20, CD22, CD228, CD248, CD30, CD33, CD37, CD48, CD7, CD71, CD79b, CLDN18.2, CLDN6, c-MET, EGFR, EphA2, ETBR, FCRH5, GCC, Globo H, gpNMB, HER-2, IL7R, интегрин бета-6, KAAG-1, LGR5, LIV-1, LRRC15, Ly6E, мезотелина (MSLN), MET, MRC2, MUC16, NaPi2b, нектин-4, OT-MUC1 (онко-связанного-MUC1), PSMA, ROR1, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, STEAP-1, STn, TIM-1, TRA-1-60 и опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG-72).

27. Способ по любому из пп. 1-25, где первое антитело связывает антиген, выбранный из BCMA, GPC1, CD30, cMET, SAIL, HER3, CD70, CD46, CD48, HER2, 5T4, ENPP3, CD19, EGFR и EphA2.

28. Способ по любому из пп. 1-25, где первое антитело связывает антиген,

выбранный из Her2, TROP2, BCMA, cMet, интегрин альфаVбета6 (интегрин $\alpha V\beta 6$), CD22, CD79b, CD30, CD19, CD70, CD228, CD47 и CD48.

29. Способ по любому из пп. 1-25, где первое антитело связывает антиген, выбранный из CD142, интегрин бета-6, интегрин альфаVбета6, ENPP3, CD19, Ly6E, cMET, C4.4a, CD37, MUC16, STEAP-1, LRRC15, SLITRK6, ETBR, FCRH5, Ax1, EGFR, CD79b, BCMA, CD70, PSMA, CD79b, CD228, CD48, LIV-1, EphA2, SLC44A4, CD30 и sTn.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где разрушителем тубулина является ауристин, тубулизин, колхицин, алкалоид барвинка, таксан, криптофицин, майтансиноид или гемиастерлин.

31. Способ по п. 30, где разрушителем тубулина является ауристин.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где разрушителем тубулина является долостатин-10, MMAE (N-метилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-норэфедрин), MMAF (N-метилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин), ауристин F, AEB, AEBV или AFP (ауристин фенилаланин фенилендиамин).

33. Способ по любому из пп. 1-32, где разрушителем тубулина является MMAE.

34. Способ по п. 33, где MMAE конъюгирован с первым антителом через линкер, содержащий валин и цитруллин.

35. Способ по п. 34, где линкер-MMAE представляет собой vcMMAE.

36. Способ по п. 33, где MMAE конъюгирован с первым антителом через линкер, содержащий лейцин, аланин и глутаминовую кислоту.

37. Способ по п. 36, где линкер-MMAE представляет собой dLAE-MMAE.

38. Способ по любому из пп. 1-32, где разрушителем тубулина является MMAF.

39. Способ по любому из пп. 1-32, где разрушителем тубулина является тубулизин.

40. Способ по п. 39, где тубулизин выбран из тубулизина D, тубулизина M, тубуфенилаланина и тубутирозина.

41. Способ по любому из пп. 1-32, где конъюгат антитело-лекарственное средство выбран из AbGn-107 (Ab1-18Hr1), AGS62P1 (ASP1235), ALT-P7 (HM2-MMAE), BA3011 (CAB-AXL-ADC), белантамаба мафодотина, брентуксимаба ведотина, цирмтузумаба ведотина (VLS-101, UC-961ADC3), кофетузумаба пелидотина (PF-06647020, PTK7-ADC, PF-7020, ABBV-647), CX-2029 (ABBV-2029), диситамаба ведотина (RC48), энапотамба ведотина (HuMax-AXL-ADC, AXL-107-MMAE), энфортумаба ведотина (EV), FS-1502 (LCB14-0110), гемтузумаба озогамицина, HTI-1066 (SHR-A1403), инотузумаба озогамицина, PF-06804103 (NG-HER2 ADC), полатузумаба ведотина, сацитузумаба говитекана, SGN-B6A, SGN-CD228A, SGN-STNV, STI-6129 (CD38 ADC, LNDS1001, CD38-077 ADC), телисотузумаба ведотина (ABBV-399), тизотумаба ведотина (Humax-TF-ADC, tf-011-mmae, TV), трастузумаба дерукстекана, трастузумаба эмтанзина и ворсетузумаба мафодотина.

42. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к клаудину-18.2, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID

NO: 61-66.

43. Способ по п. 42, где антитело к клаудину-18.2 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

44. Способ по п. 43, где антитело к клаудину-18.2 представляет собой золбетуксимаб (175D10).

45. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к клаудину-18.2, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 69-74.

46. Способ по п. 45, где антитело к клаудину-18.2 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

47. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к PD-L1, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 77-82.

48. Способ по п. 47, где антитело к PD-L1 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

49. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к ALP, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 85-90.

50. Способ по п. 49, где антитело к ALP содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

51. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело содержит антитело к B7H4, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 93-98.

52. Способ по п. 51, где антитело к B7H4 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

53. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к HER2, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:100.

54. Способ по п. 53, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой диситамаб ведотин.

55. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к NaPi2B, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102.

56. Способ по п. 55, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой лифастузумаб ведотин.

57. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к нектину-4, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 105-110.

58. Способ по п. 57, где антитело к клаудину-4 представляет собой антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

59. Способ по п. 58, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой энфортумаб ведотин.

60. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к AVB6, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 113-118.

61. Способ по п. 60, где антитело к AVB6 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

62. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к AVB6, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 121-126.

63. Способ по п. 62, где антитело к AVB6 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

64. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к CD228, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 129-134.

65. Способ по п. 64, где антитело к CD228 содержит переменную область тяжелой

цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128.

66. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к LIV-1, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 137-142.

67. Способ по п. 66, где антитело к LIV-1 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

68. Способ по любому из пп. 1-41, где первое антитело представляет собой антитело к тканевому фактору, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 145-150.

69. Способ по п. 68, где антитело к тканевому фактору содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144.

70. Способ по п. 69, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой тизотумаб ведотин.

71. Способ по любому из пп. 1-70, где второе антитело связывает активатор иммунных клеток, выбранный из рецептора антимюллерова гормона II (AMHR2), B7, B7H1, B7H2, B7H3, B7H4, BAFF-R, BCMA (антиген созревания В-клеток), Bst1/CD157, комплемента C5, хемокинового рецептора CC 4 (CCR4), CD123, CD137, CD19, CD20, CD25 (IL2RA), CD276, CD278, CD3, CD32, CD33, CD37, CD38, CD4 и HIV-1 сайтов связывания gp120, CD40, CD70, CD70 (член семейства лигандов рецептора ФНО), CD80, CD86, клаудина 18.2, c-MET, CSF1R, CTLA-4, EGFR, EGFR MET протоонкогена, ERHA3, ERBB2, ERBB3, FGFR2b, FLT3, GITR, глюкокортикоид-индуцированного рецептора ФНО (GITR), HER2, HER3, HLA, ICOS, IDO1, IFNAR1, IFNAR2, IGF-1R, IL-3Ральфа (CD123), IL-5R, IL-5Ральфа, LAG-3, протоонкогена MET, OX40 (CD134), PD-1, PD-L1, PD-L2, PVRIG, сильно гликозилированного муциноподобного домена гликопротеина (GP) EBOV респираторно-синцитиального вируса (RSV), резуса (Rh) D, иммуноглобулин-подобных лектинов 8, связывающих сиаловую кислоту (Siglec-8), сигнальной молекулы активации лимфоцитов (SLAMF7/CS1), антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами Т-клеточного рецептора (CTLA4), TIGIT, TIM3 (HAVCR2), опухолеспецифического гликоэпитопа Muc1 (TA-Muc1), VSIR (VISTA) и VTCN1.

72. Способ по любому из пп. 1-71, где второе антитело связывает TIGIT.

73. Способ по п. 72, где второе антитело содержит:

CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

выбранную из SEQ ID NO: 7-9;

CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10-13;

CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-16;

CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

74. Способ по п. 72, где второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности:

SEQ ID NO: 7, 10, 14, 17, 18 и 19, соответственно; или

SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 18 и 19, соответственно; или

SEQ ID NO: 9, 12, 15, 17, 18 и 19, соответственно; или

SEQ ID NO: 8, 13, 16, 17, 18 и 19, соответственно; или

SEQ ID NO: 8, 12, 16, 17, 18 и 19, соответственно.

75. Способ по п. 72, где второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

76. Способ по п. 72, где второе антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20-24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

77. Способ по любому из пп. 1-71, где второе антитело связывает CD40.

78. Способ по п. 77, где второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности: (a) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 и 35, соответственно; или (b) SEQ ID NO: 30, 36, 32, 33, 34 и 35, соответственно.

79. Способ по п. 77, где второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

80. Способ по п. 77, где второе антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

81. Способ по любому из пп. 1-71, где второе антитело связывает CD70.

82. Способ по п. 81, где второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 53-58, соответственно.

83. Способ по п. 81, где второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

84. Способ по любому из пп. 1-71, где второе антитело связывает ВСМА.

85. Способ по п. 84, где второе антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 47-52, соответственно.

86. Способ по п. 84, где второе антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

87. Способ по любому из пп. 1-86, где второе антитело представляет собой антитело IgG1 или IgG3.

88. Способ по любому из пп. 1-87, где второе антитело содержится в композиции антител, причем по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител в композиции являются нефукозилированными.

89. Способ по п. 88, где каждое антитело в композиции содержит те же аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, что и второе антитело.

90. Способ по любому из пп. 1-89, где Fc второго антитела обладает повышенным связыванием с одним или более активирующими FcγR по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа, при этом активирующие FcγR включают один или более из FcγRIIIa, FcγRIIa и/или FcγRI.

91. Способ по п. 90, где Fc второго антитела имеет усиленное связывание с FcγRIIIa.

92. Способ по любому из пп. 1-91, где Fc второго антитела имеет пониженное связывание с одним или более ингибиторными FcγR по сравнению с соответствующим Fc дикого типа того же изотипа.

93. Способ по п. 92, где Fc второго антитела имеет пониженное связывание с FcγRIIb.

94. Способ по любому из пп. 1-93, где Fc второго антитела имеет повышенное связывание с FcγRIIIa и пониженное связывание с FcγRIIb.

95. Способ по любому из пп. 1-94, где второе антитело представляет собой моноклональное антитело.

96. Способ по любому из пп. 1-95, где второе антитело представляет собой гуманизованное антитело или человеческое антитело.

97. Способ по любому из вариантов осуществления 1-96, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, рак шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, светлоклеточный рак почки, рак головы и шеи, рак легких, аденокарциному легких, рак желудка, рак из зародышевых клеток, рак костей, рак печени, рак щитовидной железы, рак

кожи, меланому, новообразование центральной нервной системы, мезотелиому, лимфому, лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, миелому или саркому.

98. Способ по любому из пп. 1-97, где рак представляет собой лимфому, лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому Ходжкина.

99. Способ по любому из пп. 1-98, где конъюгат антитело-лекарственное средство и второе антитело вводят одновременно.

100. Способ по п. 99, где конъюгат антитело-лекарственное средство и второе антитело вводят в составе одной фармацевтической композиции.

101. Способ по любому из пп. 1-98, где конъюгат антитело-лекарственное средство и второе антитело вводят последовательно.

102. Способ по п. 101, где по меньшей мере первую дозу конъюгата антитело-лекарственное средство вводят до первой дозы второго антитела; или при этом по меньшей мере первую дозу второго антитела вводят до первой дозы конъюгата антитело-лекарственное средство.

103. Способ по любому из пп. 1-102, где второе антитело истощает Т-регуляторные клетки (Treg).

104. Способ по любому из пп. 1-103, где конъюгат антитело-лекарственное средство индуцирует иммунную память в отношении клеток, экспрессирующих антиген, связанный конъюгатом антитело-лекарственное средство.

105. Способ по п. 104, где индукция иммунной памяти включает индукцию Т-клеток памяти.

106. Способ по любому из пп. 1-105, где второе антитело активирует антигенпрезентирующие клетки (APC).

107. Способ по любому из пп. 1-106, где второе антитело усиливает ответы Т-клеток CD8.

108. Способ по любому из пп. 1-107, где второе антитело активирует костимулирующие рецепторы.

109. Способ по любому из пп. 1-108, где введение ADC и второго антитела способствует высвобождению иммуноактивирующего цитокина.

110. Способ по п. 109, где иммуноактивирующий цитокин представляет собой CXCL10 или IFN γ .

111. Способ по любому из пп. 1-110, где ADC и второе антитело действуют синергически.

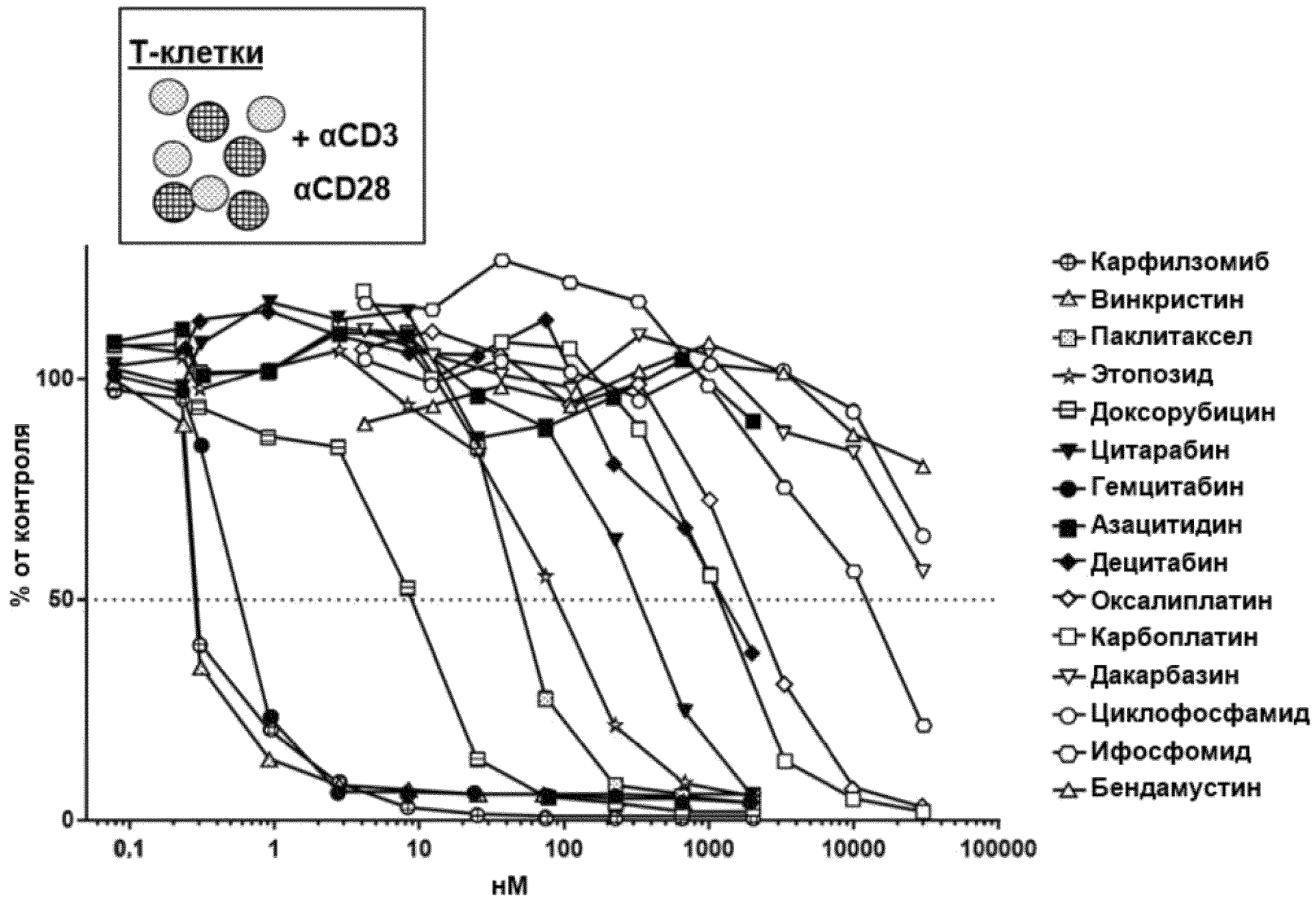
112. Способ по любому из пп. 1-111, где введение ADC и второго антитела в комбинации имеет профиль токсичности, сравнимый с профилем токсичности ADC или второго антитела при введении любого из них в виде монотерапии.

113. Способ по любому из пп. 1-112, где эффективная доза ADC и/или второго антитела при комбинированном введении меньше, чем при введении в виде монотерапии.

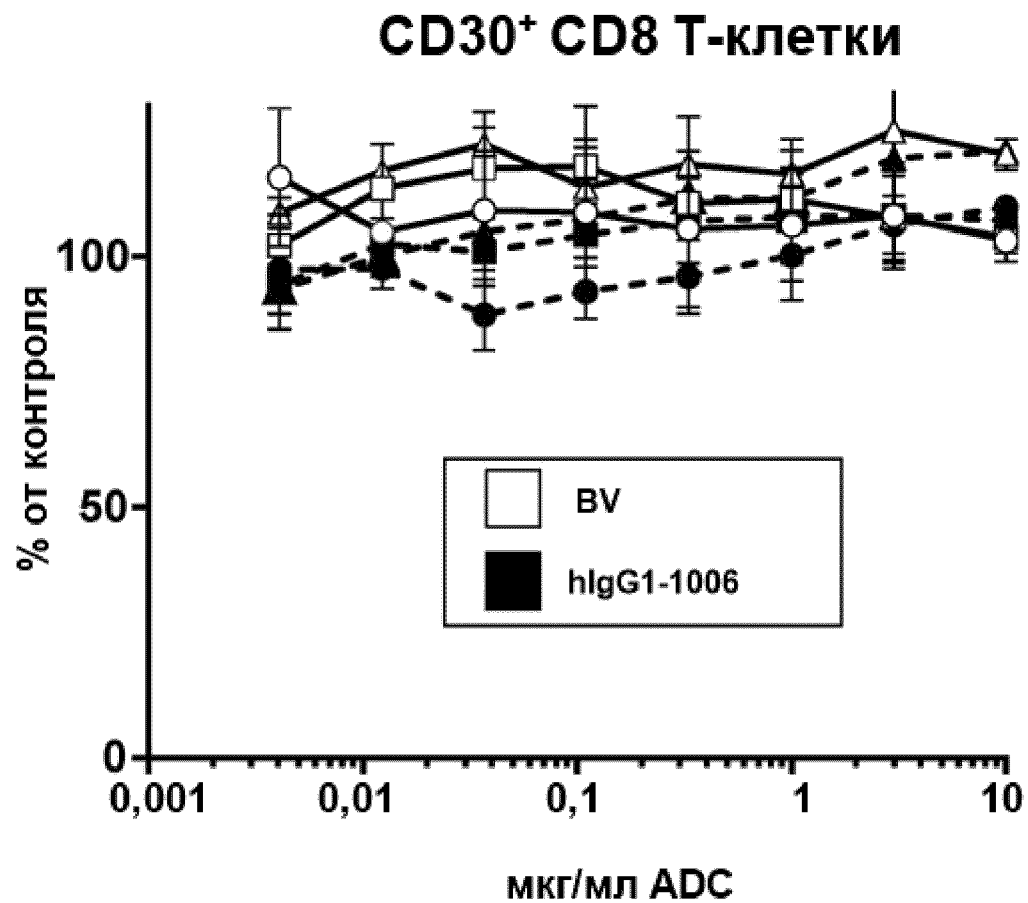
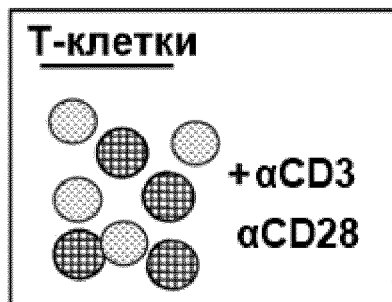
114. Способ по любому из пп. 1-113, где рак характеризуется высокой нагрузкой опухолевых мутаций.

115. Способ по любому из пп. 1-114, где рак имеет микросателлитную нестабильность.

По доверенности



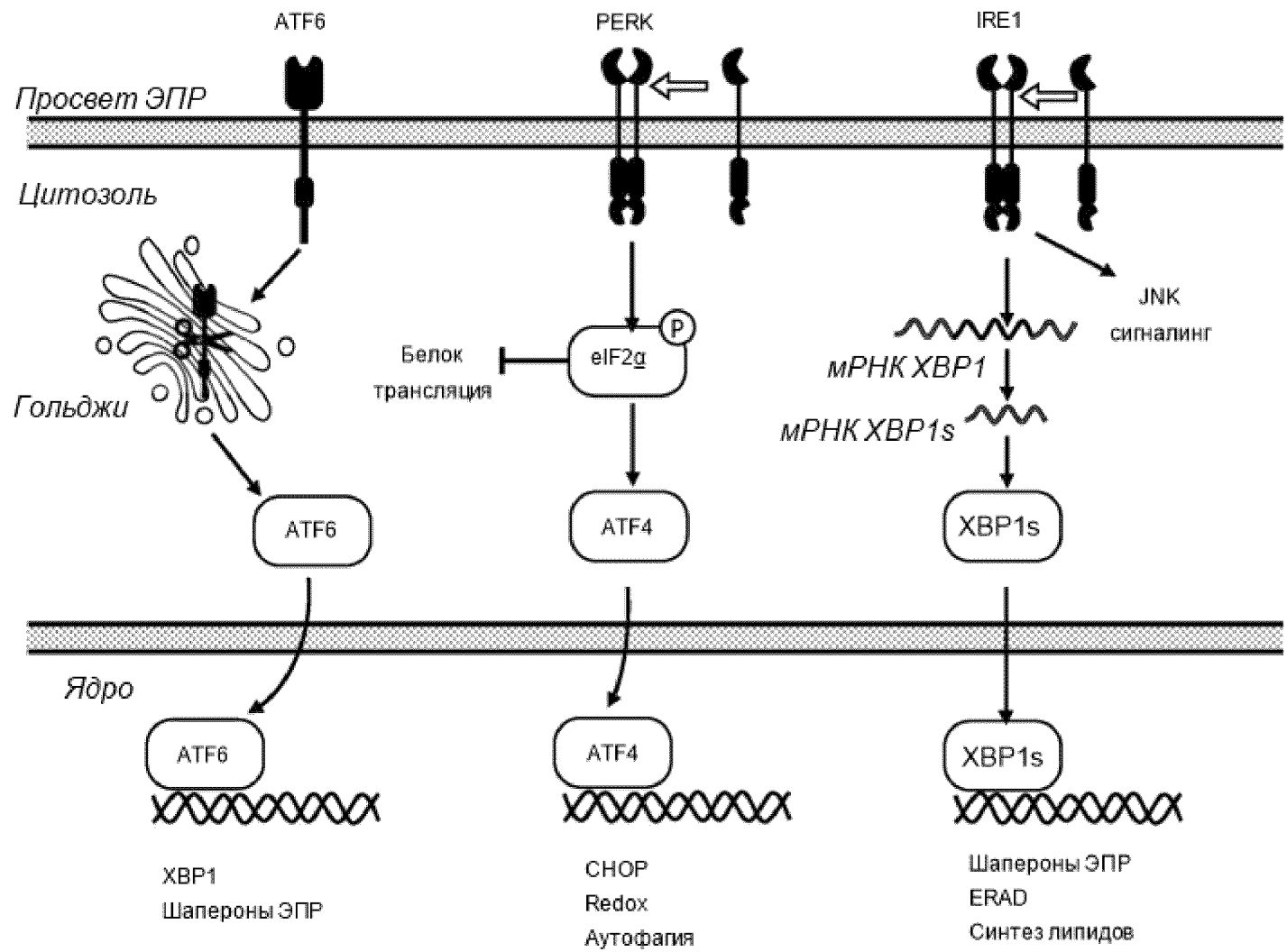
Фиг.1



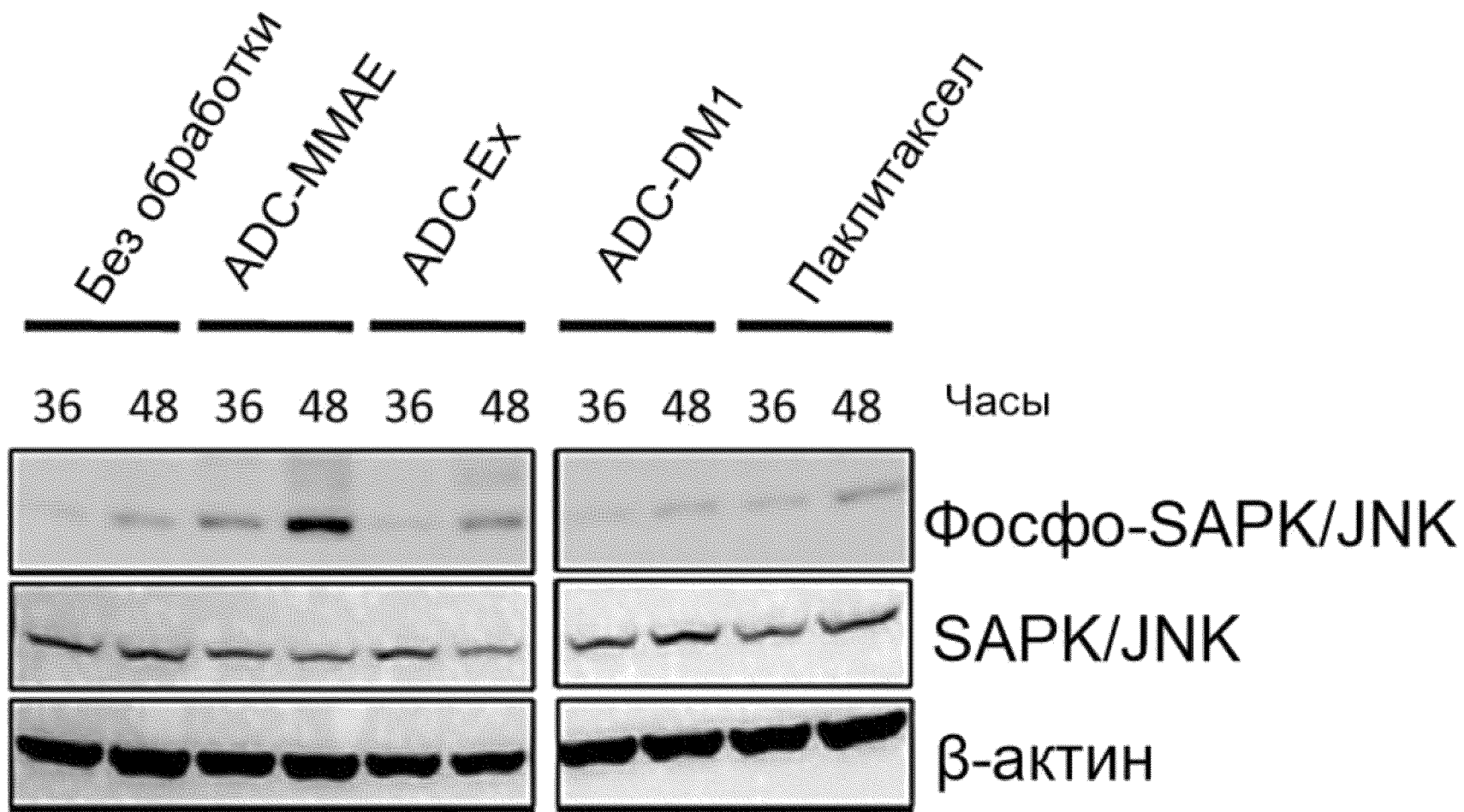
Фиг. 2

Класс полезной нагрузки	Члены	Средняя нагрузка лекарственного средства	Механизм действия
Аусистатины	ММАЕ (ведотин)	4	Разрушение микротрубочек
	ММАЕ (мафадотин)	4	
Майтансины	DM1 (эмтанзин)	4	
Камптотецины	Ех(эксатекан)	8	Ингибирование топоизомеразы

Фиг.3А

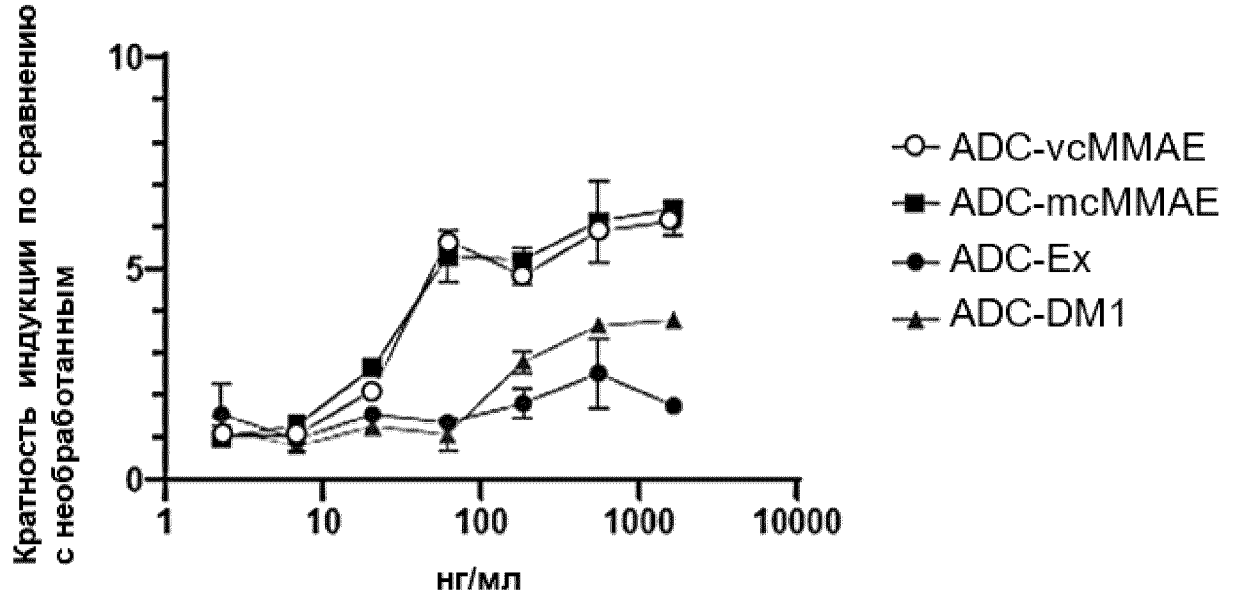


Фиг. 3В



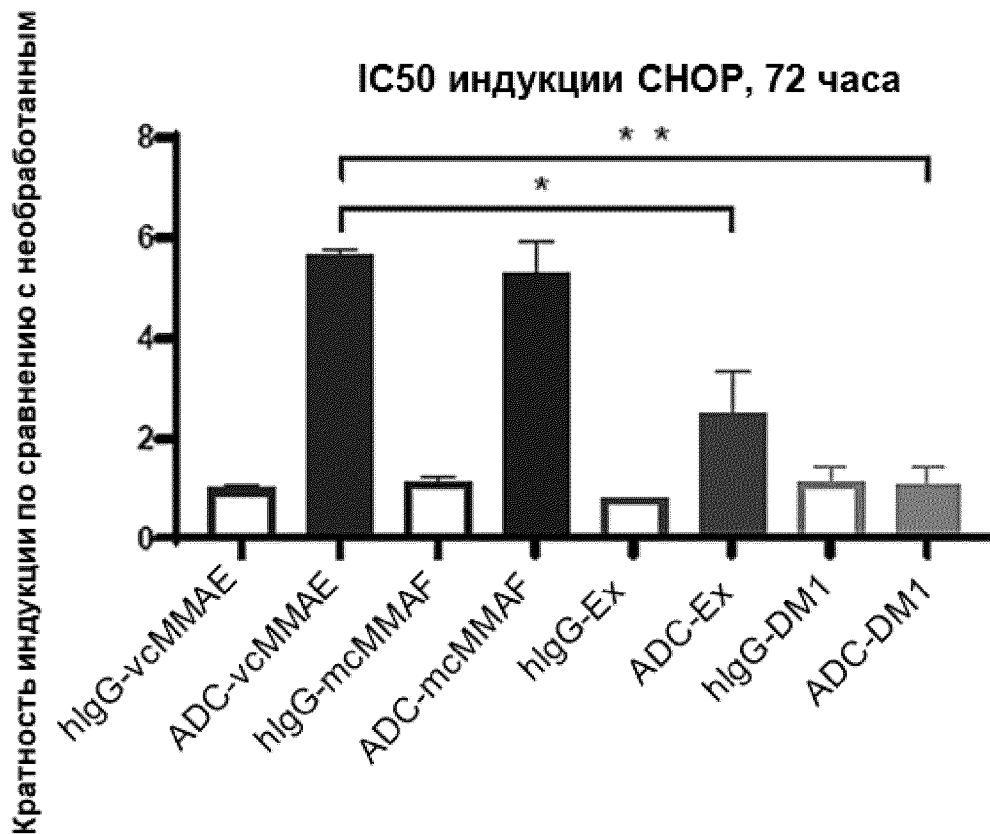
Фиг. 3С

Дозозависимая индукция СНОР, 72 часа

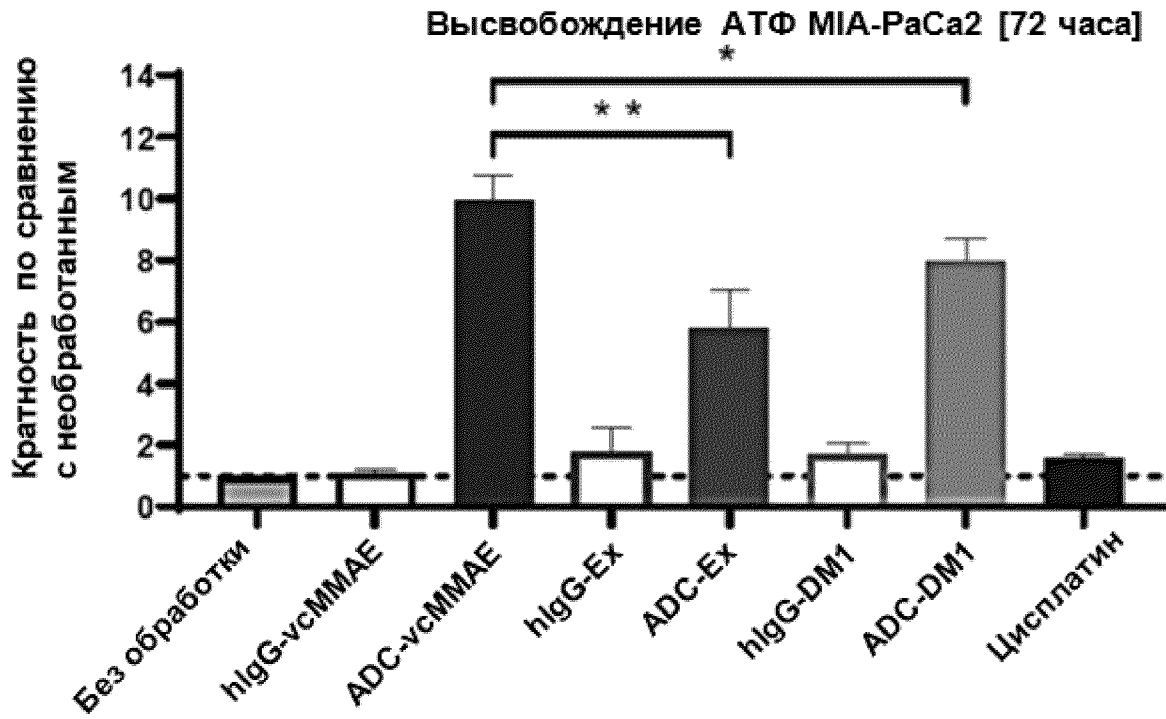


Фиг. 3D

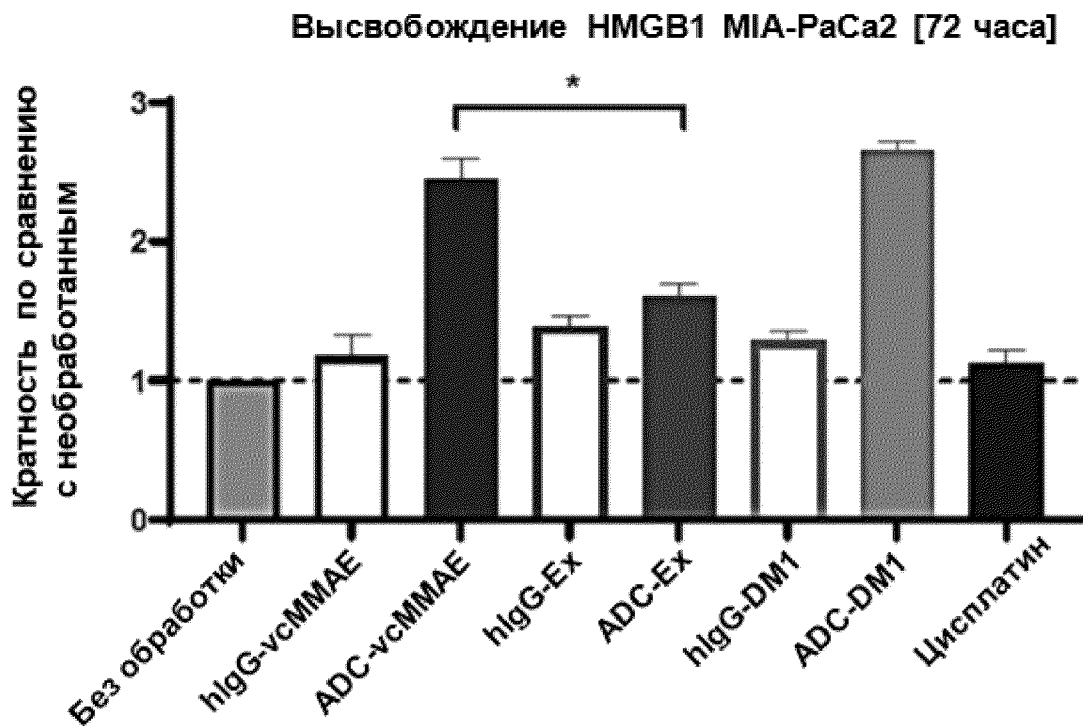
IC50 индукции СНОР, 72 часа



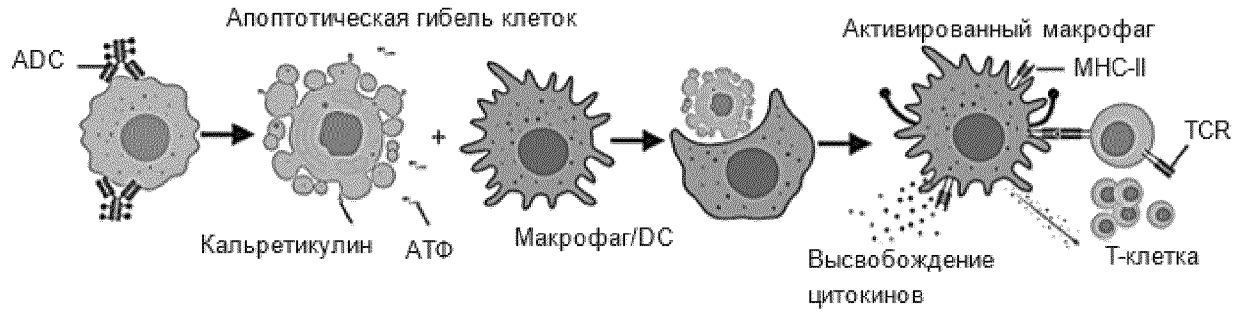
Фиг. 3E



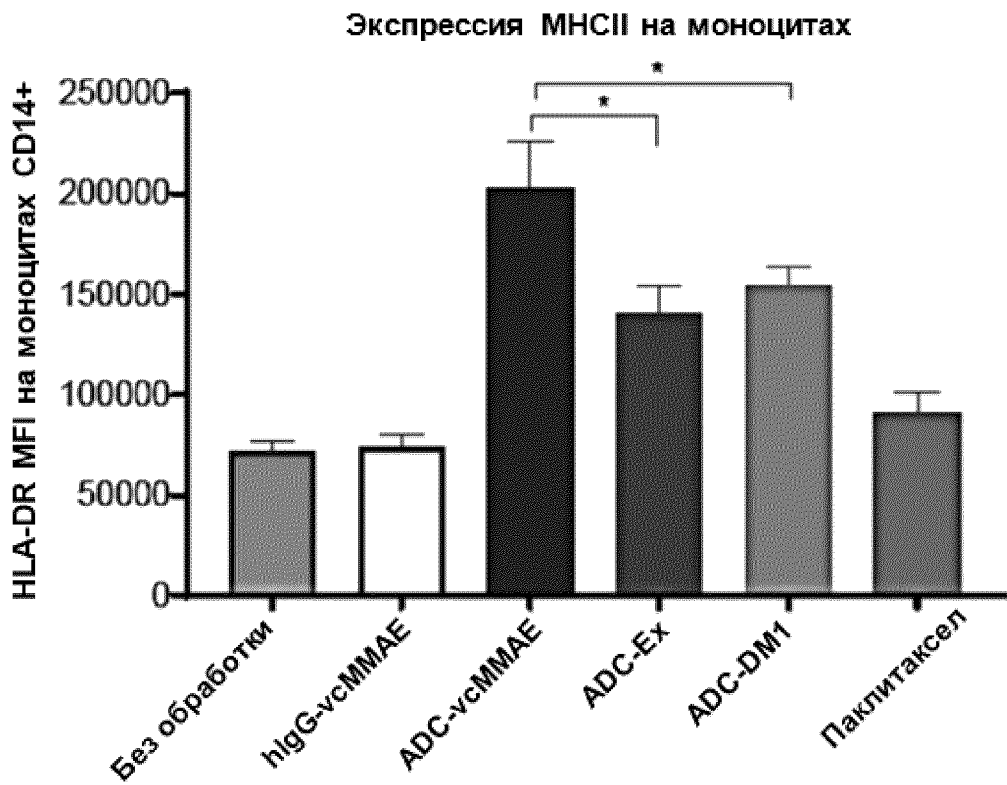
Фиг. 4А



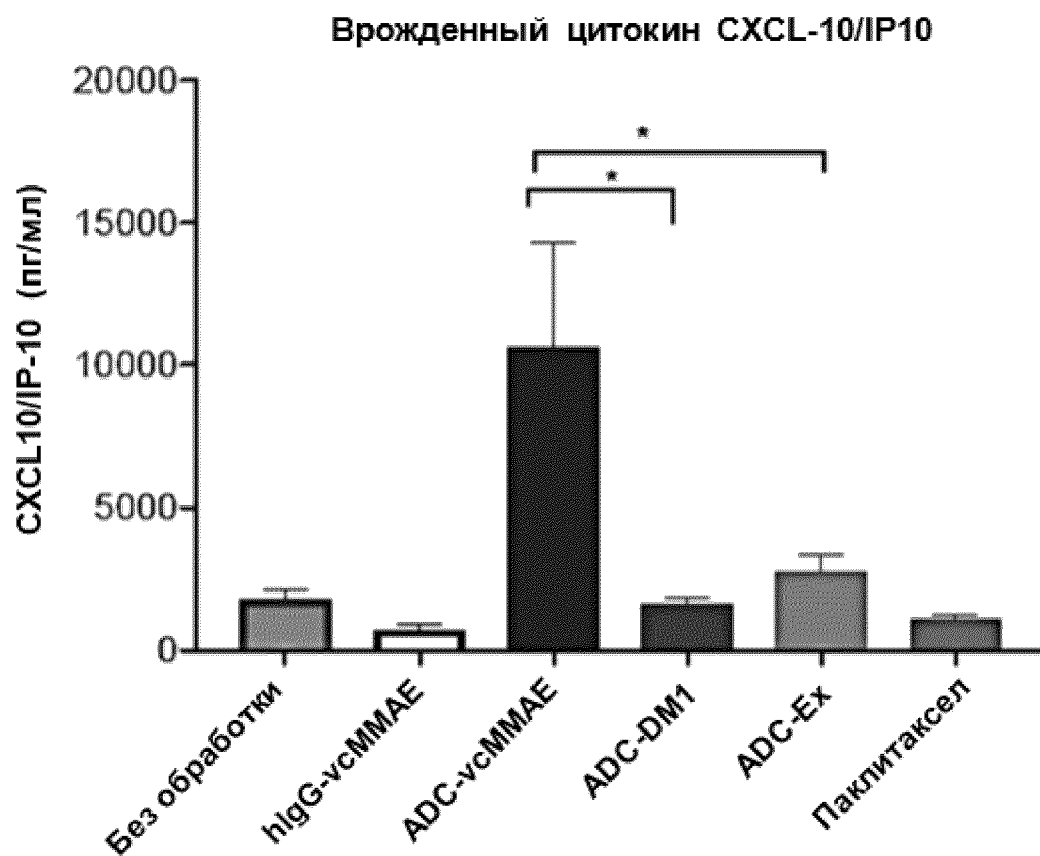
Фиг. 4В



Фиг. 5А



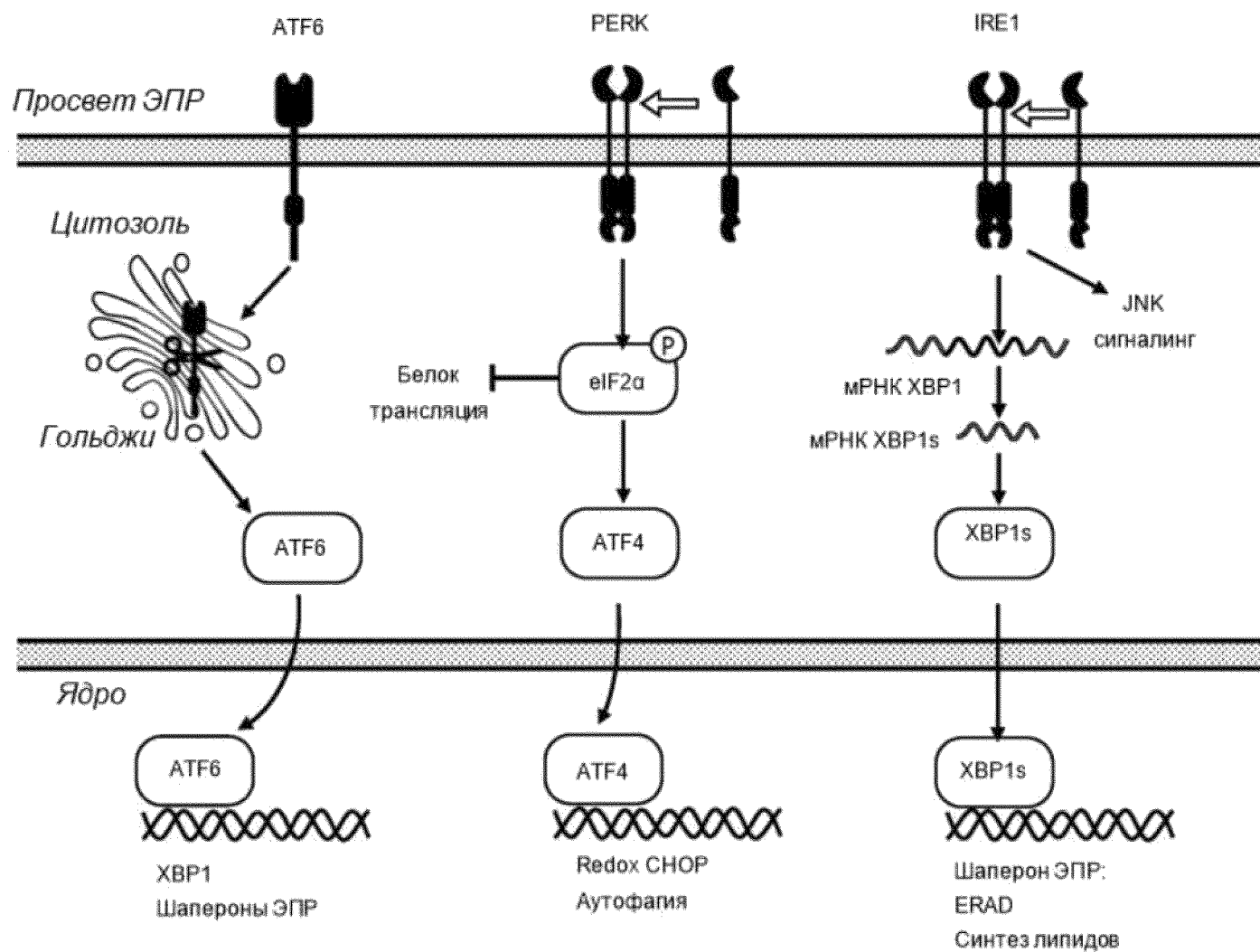
Фиг. 5В



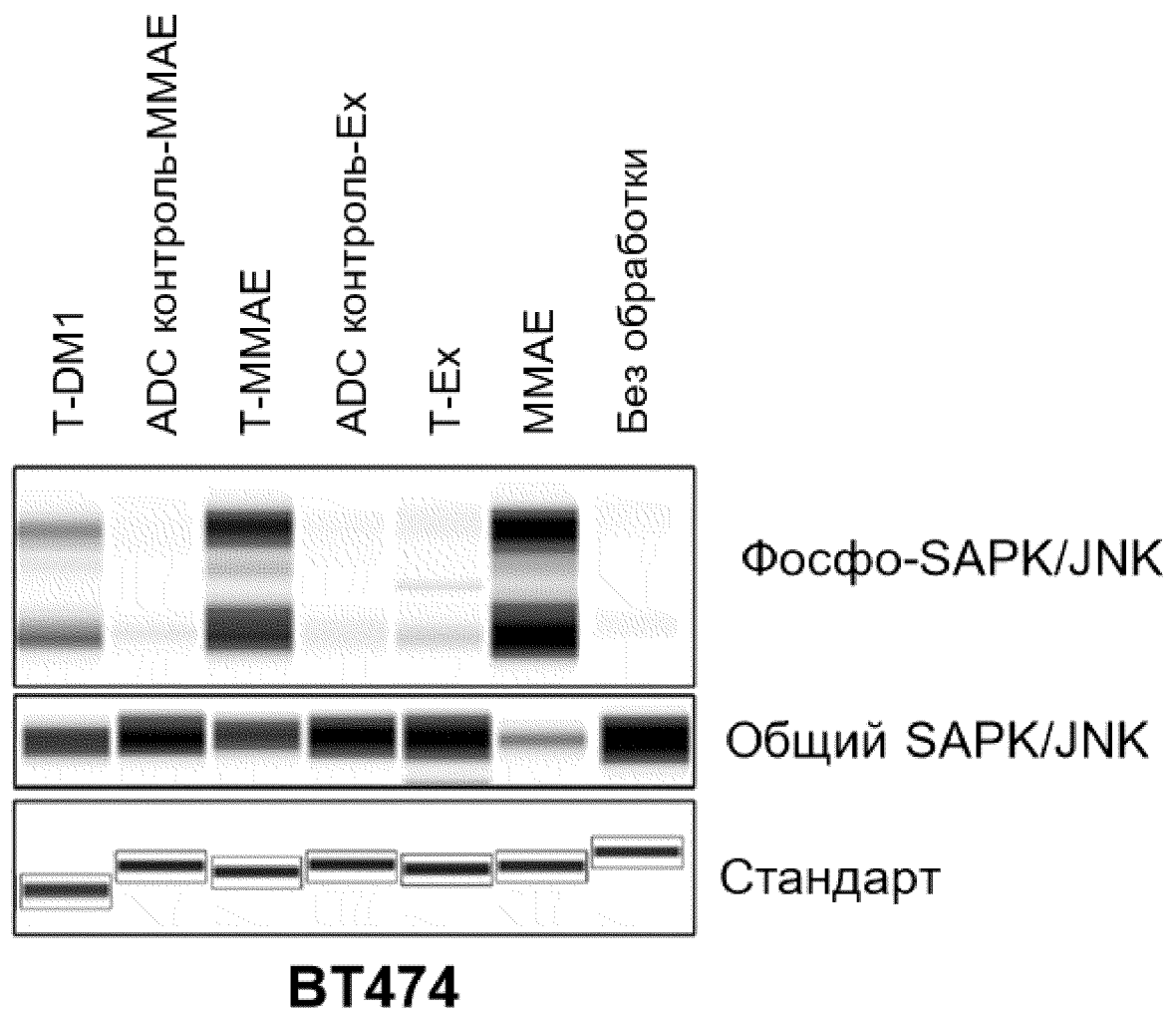
Фиг. 5С

ADC	Антитело	Полезная нагрузка
T-DM1	Трастузумаб	DM1
T-MMAE	Трастузумаб	MMAE
T-Ex	Трастузумаб	Эксатекан

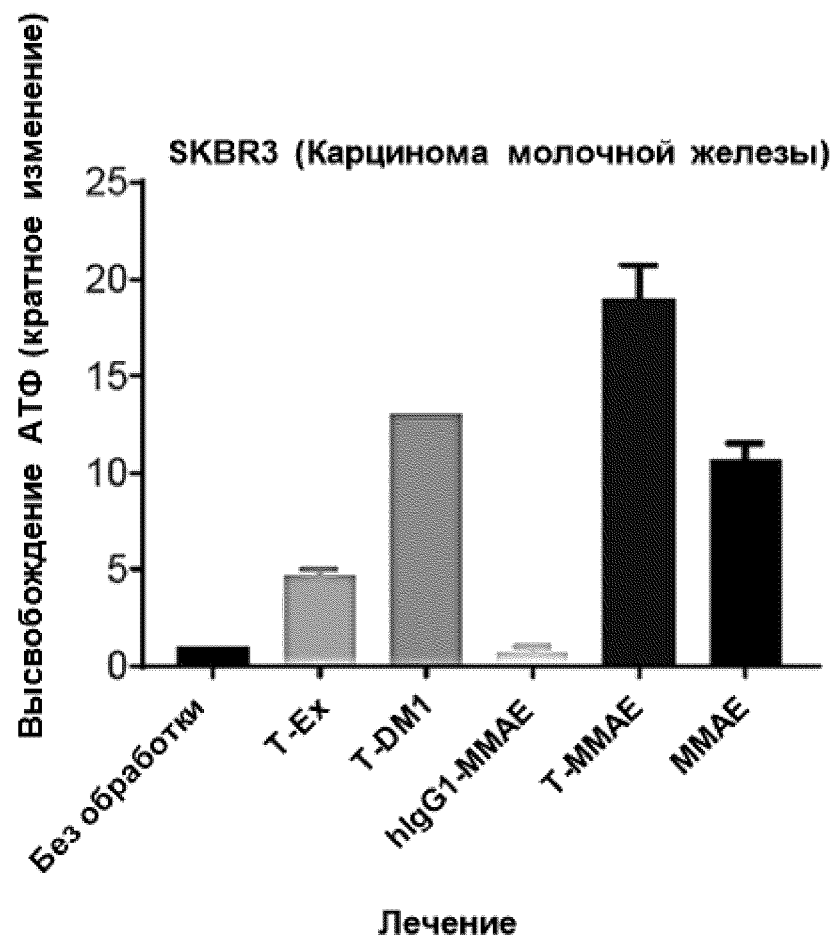
Фиг.6А



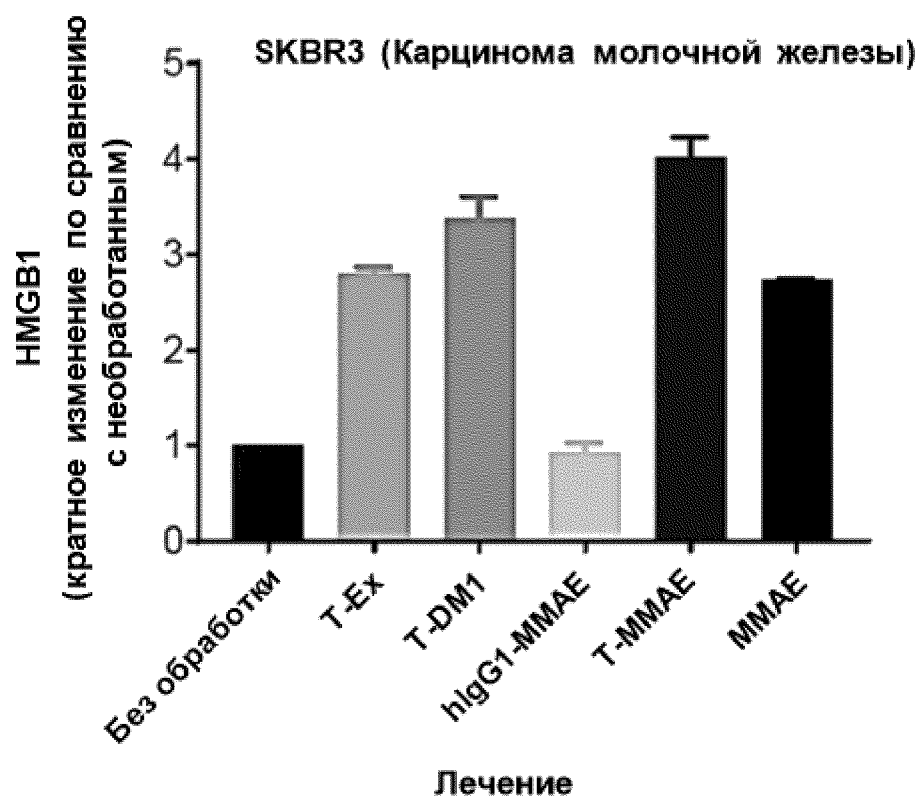
Фиг. 6В



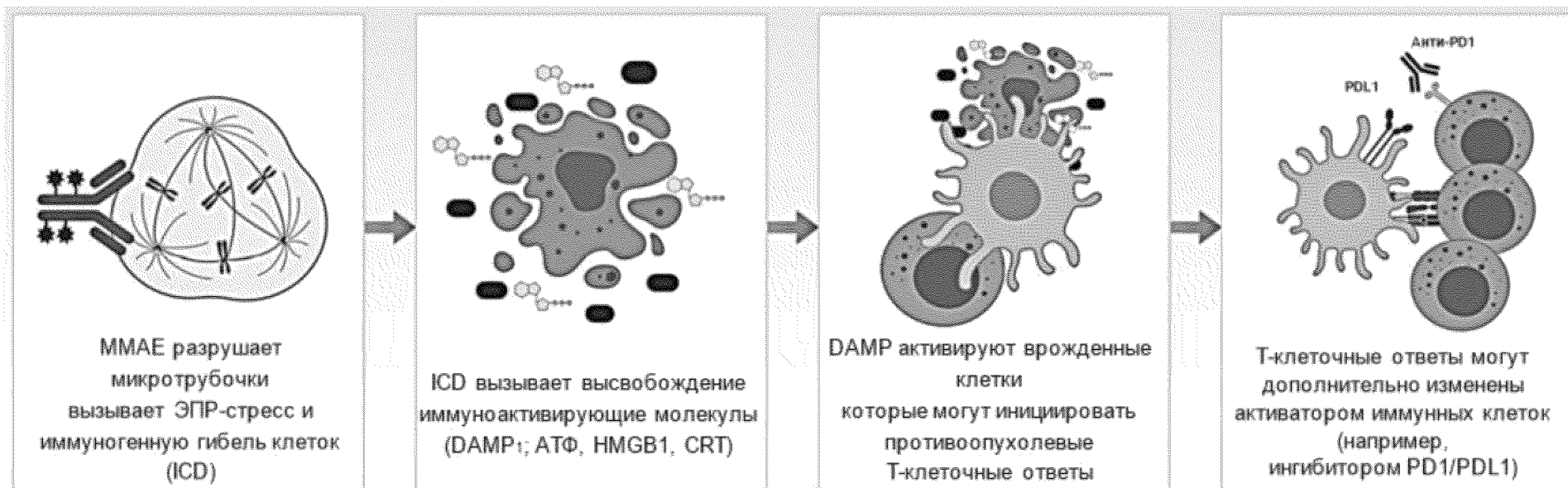
Фиг.6С



Фиг. 6D



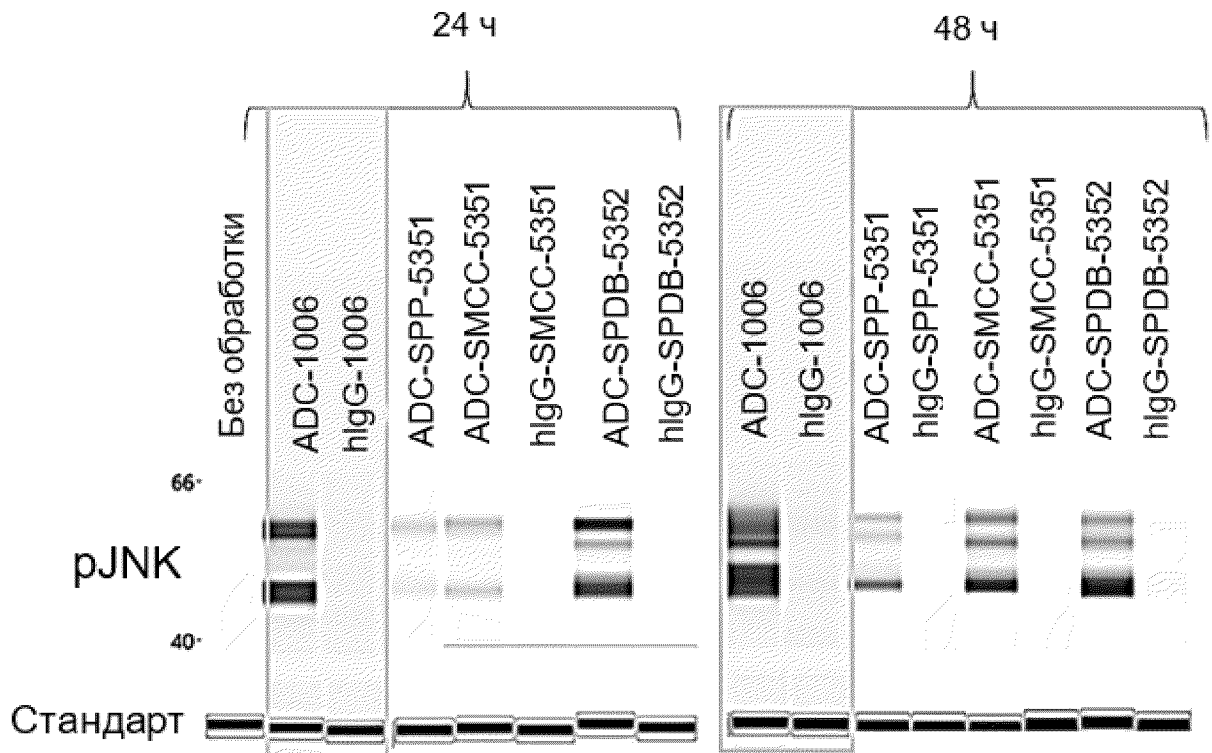
Фиг. 6E



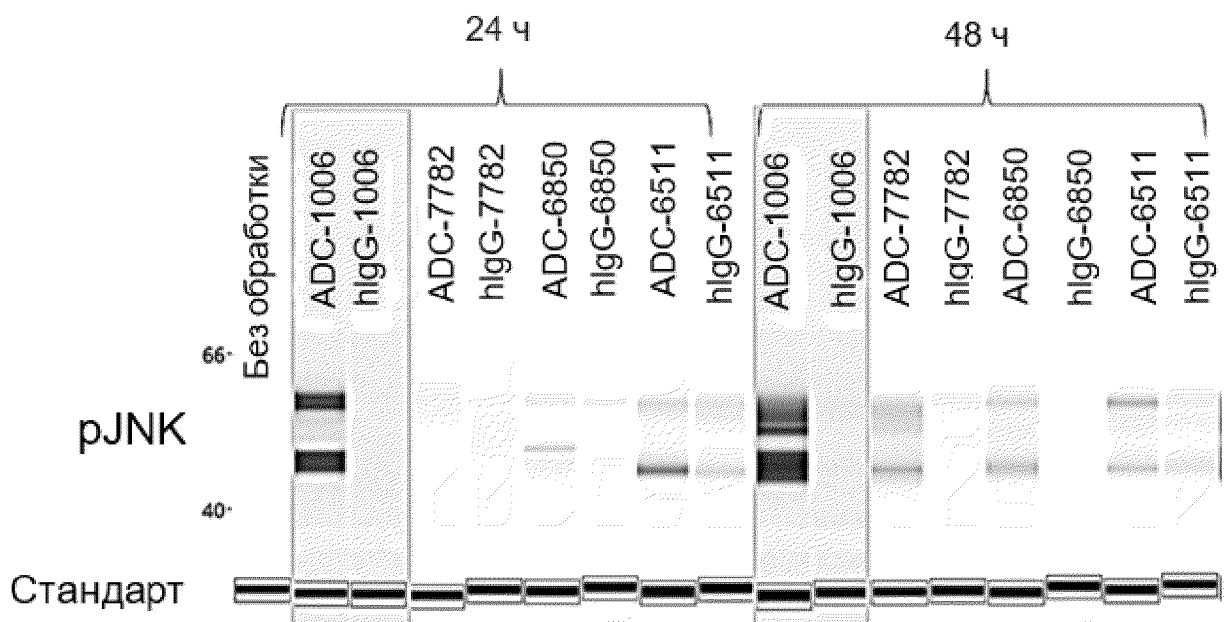
Фиг.7А

Названия	№ SGD	Клинический ADC	Сайт конъюгации и DAR	Класс полезной нагрузки	МОА
vcMMAE, Ведотин	SGD-1006	Адсетрис	DAR 4	Ауристатин	Разрушители микротрубочек
АТ	SGD-4830		DAR 8		
DM1, эмтанзин	SGD-5351	Кадсила	DAR 3.5, лизины	Майтансин	
DM1, мертанзин	SGD-5351	IMGN-901	DAR 3.5, лизины		
DM4, рабтансин	SGD-5352	IMGN-388	DAR 3.5, лизины		
Дерустекан, экзетекан	SGD-6850	DS-8201a (Энэрту)	DAR 8	Камптотецин	Ингибитор топоизомеразы I
Говитекан, SN-38	SGD-6511	Сацитузумаб Говитекан (Троделви)	DAR 8		
CPT SeaGen, MAD-CPT	SGD-7782		DAR 8		
mp-EDA-PNU	SGD-8335		DAR 4	Антрациклин	Ингибиторы топоизомеразы I/II, повреждение ДНК, образование АФК
mp-Gluc-DXZ	SGD-8248		DAR 8		
Озогамицин	SGD-8677	Милотарг	DAR 2-3, лизины	Калихеамицин	расщепление ДНК
Тезирин	SGD-7455	ADCT-301	DAR 2,3	PBD	алкилаторы ДНК

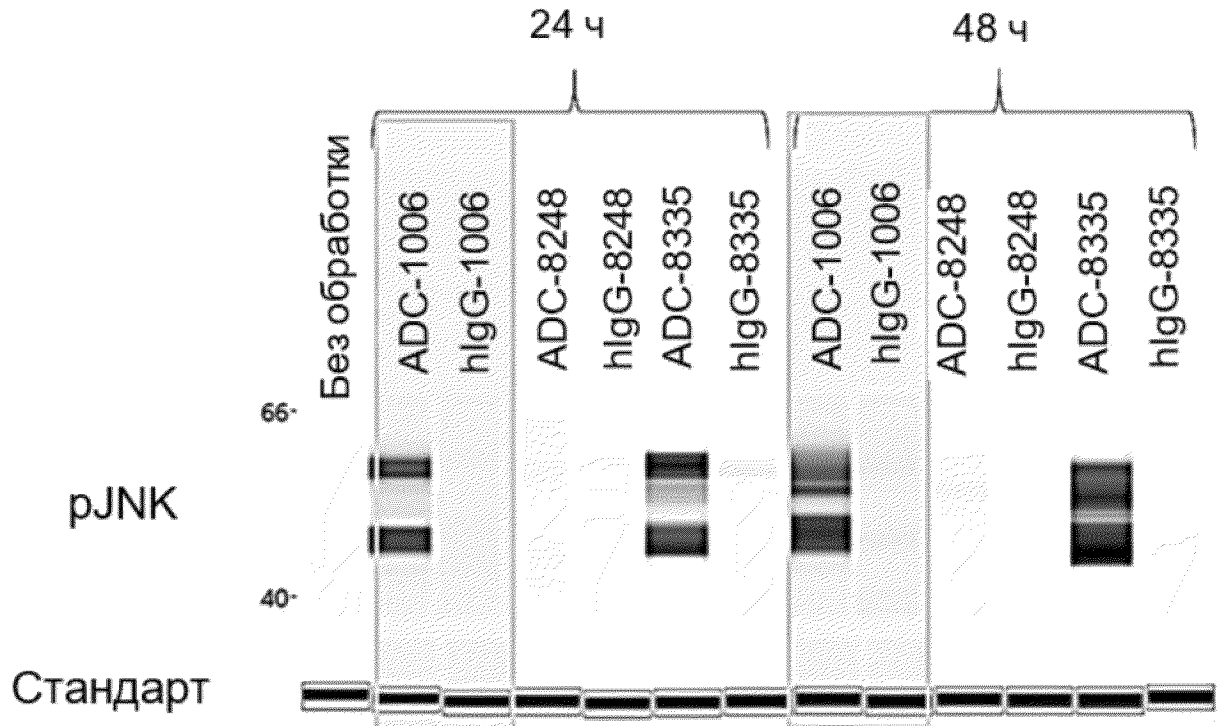
Фиг.7В



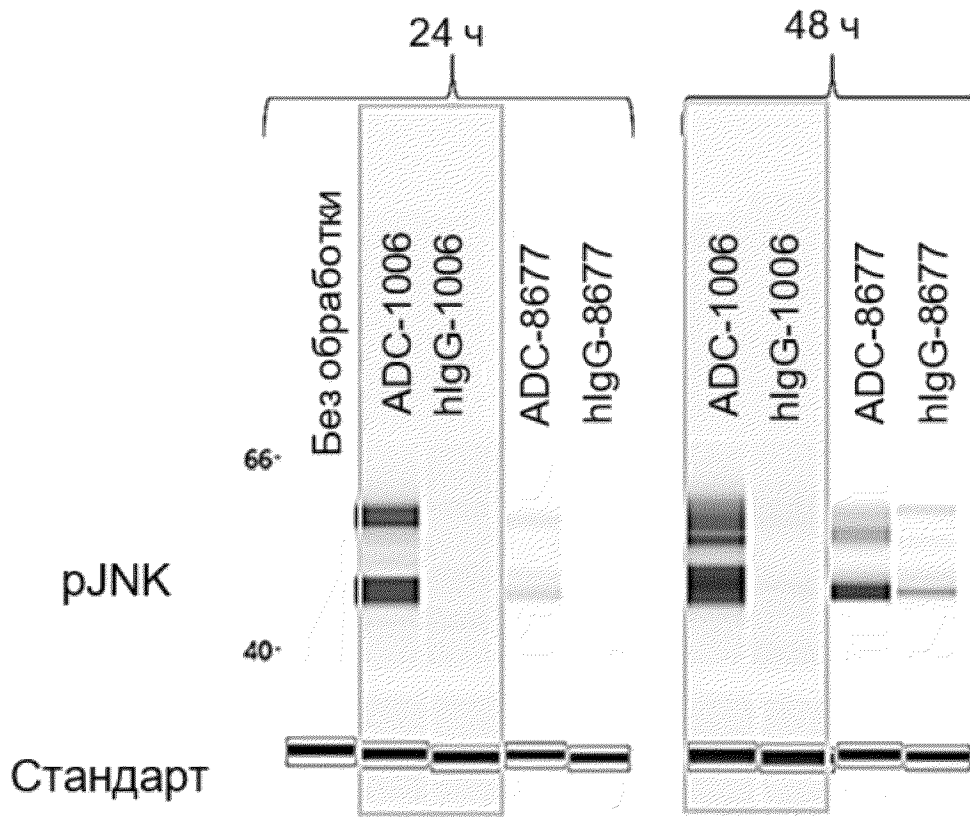
Фиг.7С



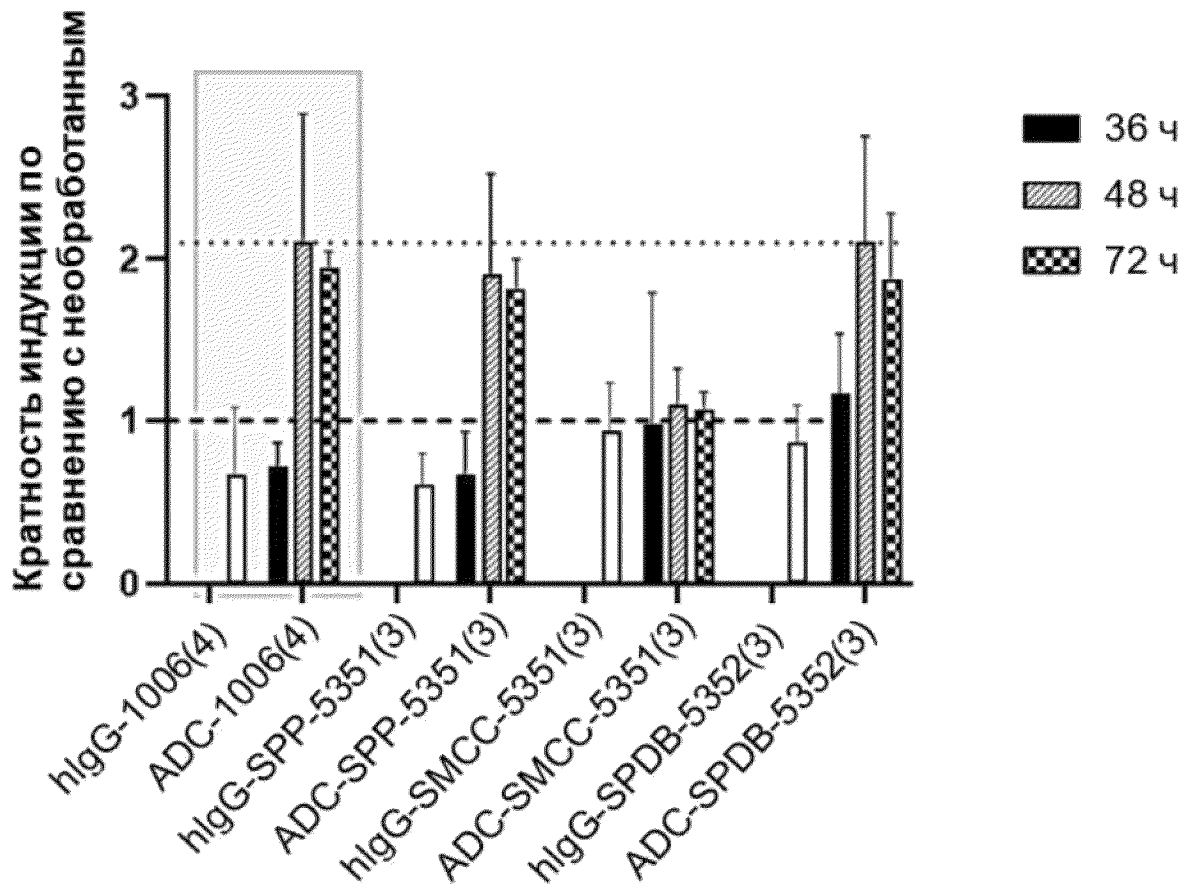
Фиг.7D



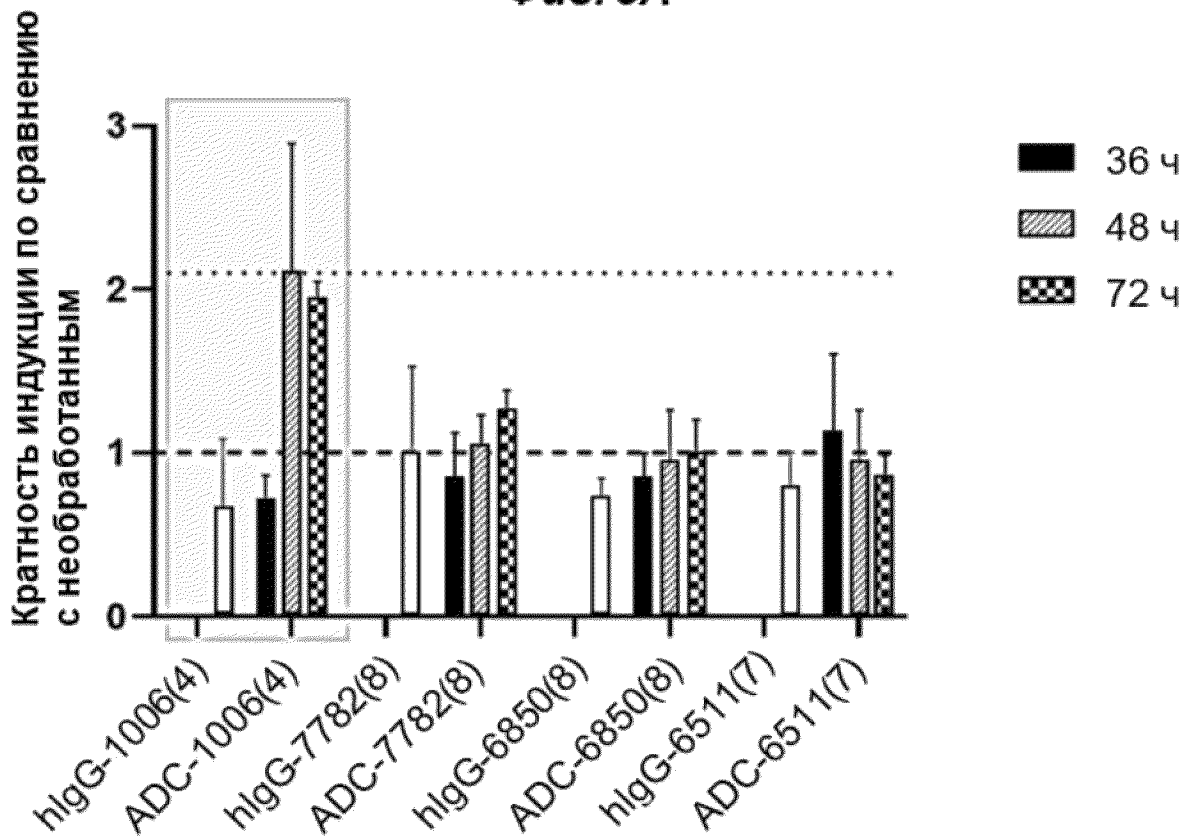
Фиг. 7E



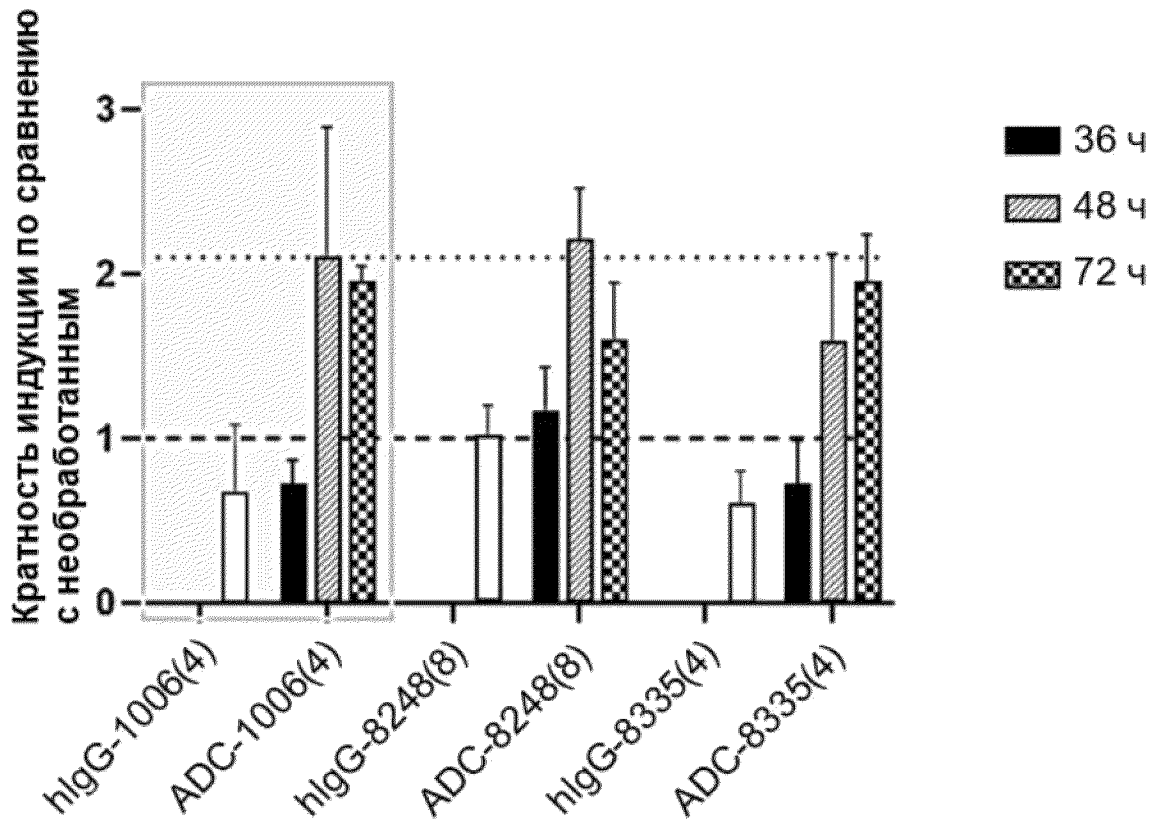
Фиг. 7F



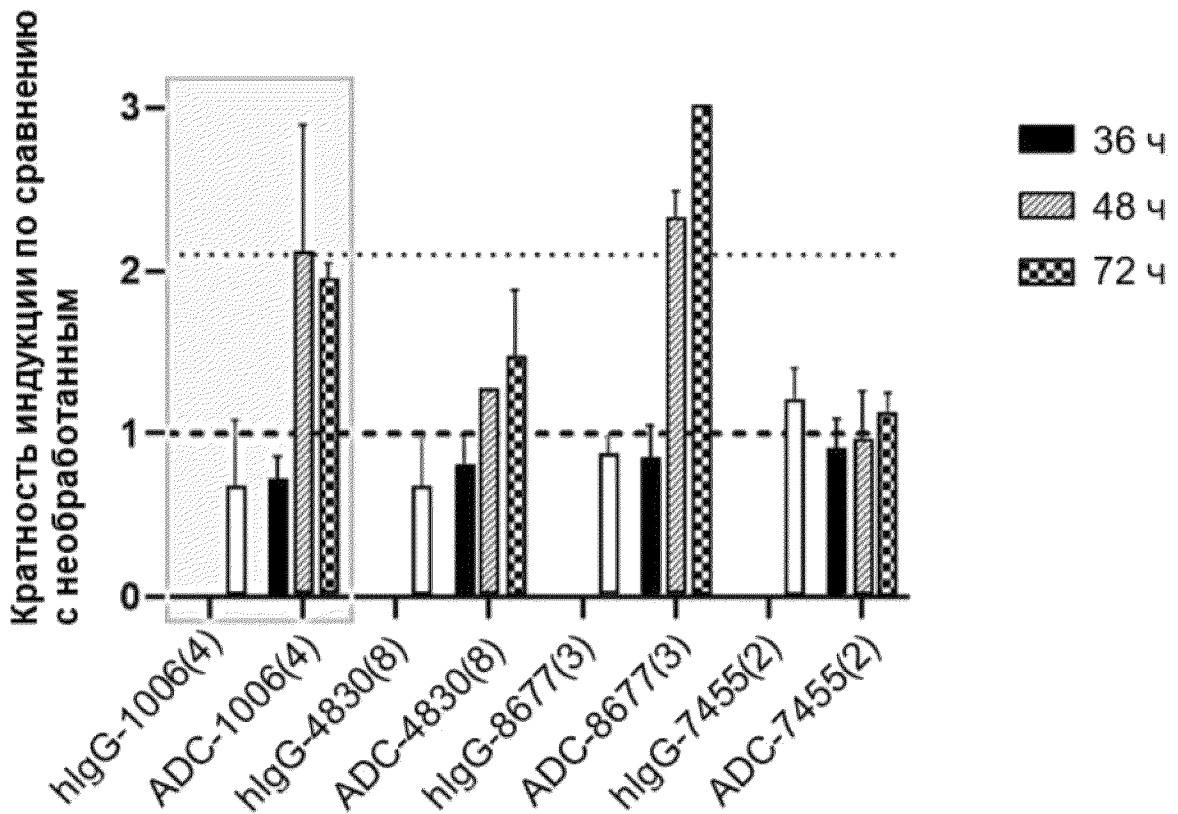
Фиг. 8А



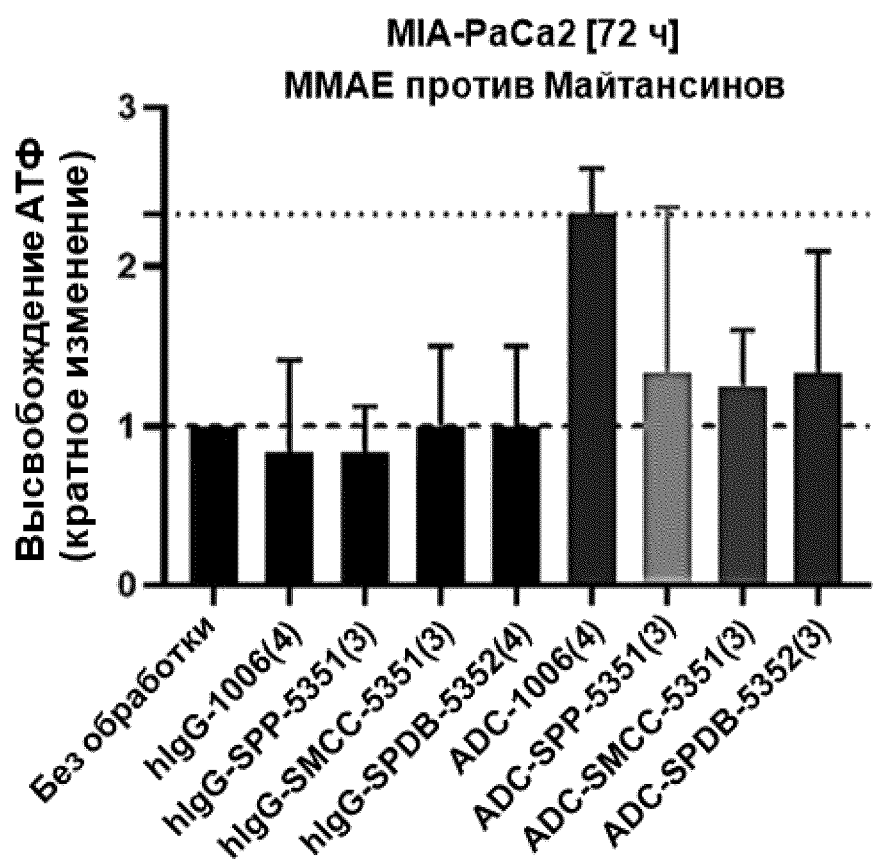
Фиг. 8В



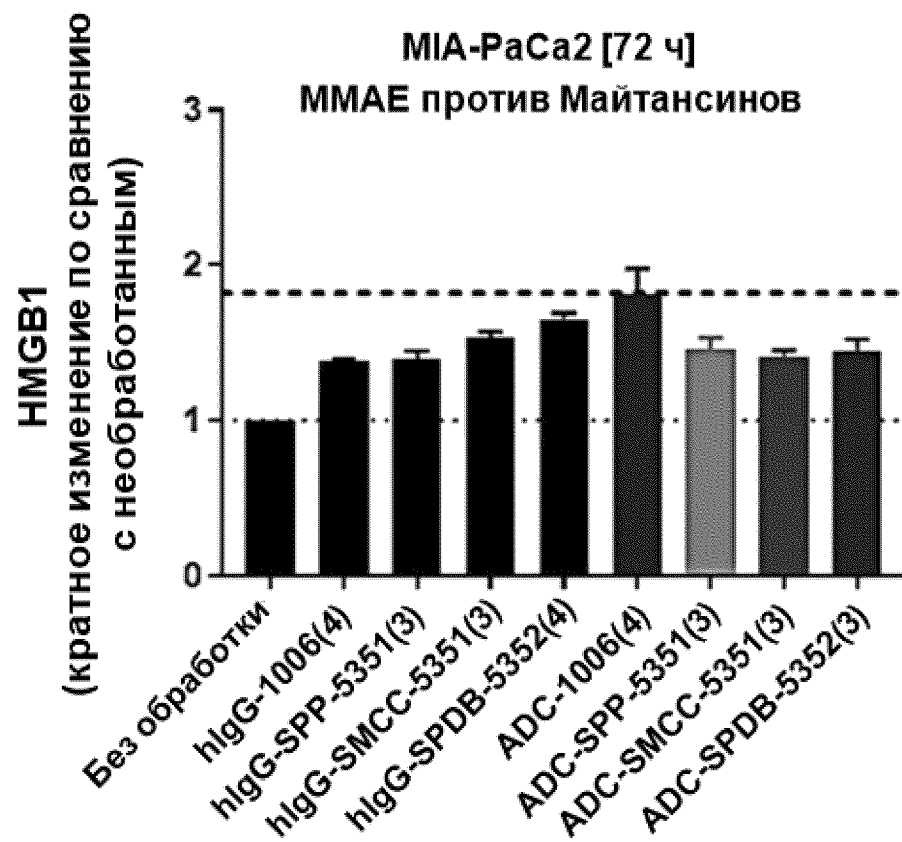
Фиг. 8С



Фиг. 8D

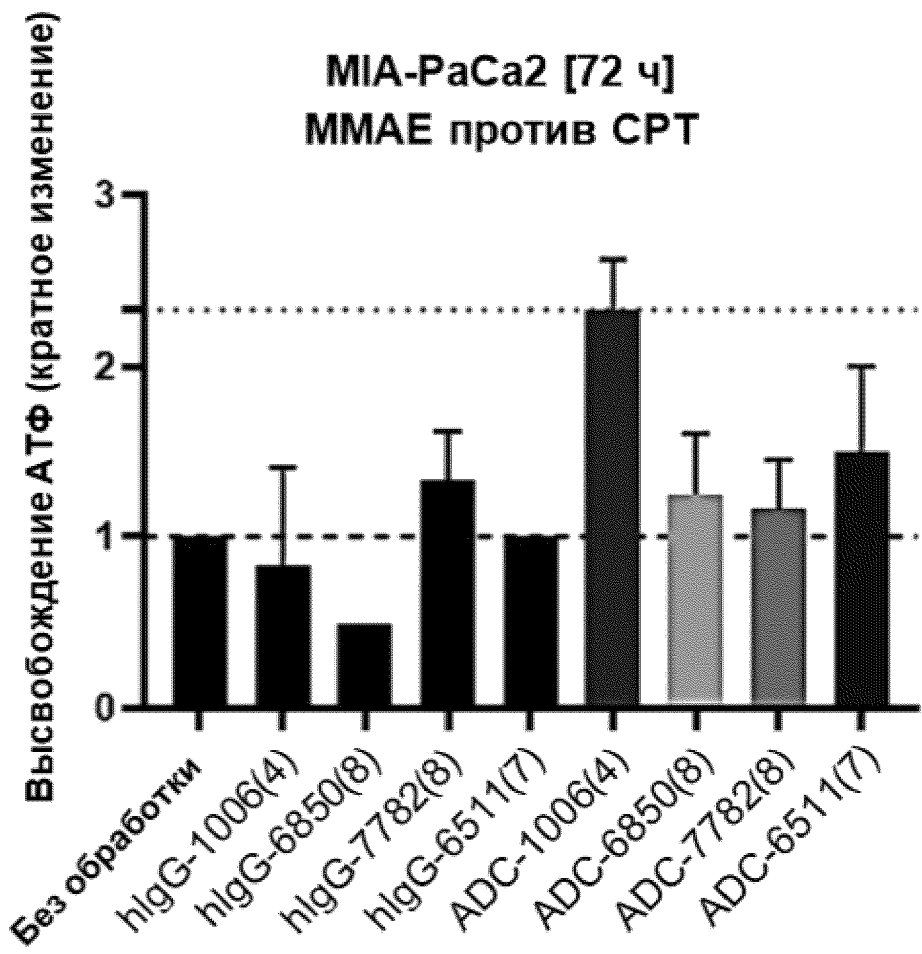


АТФ

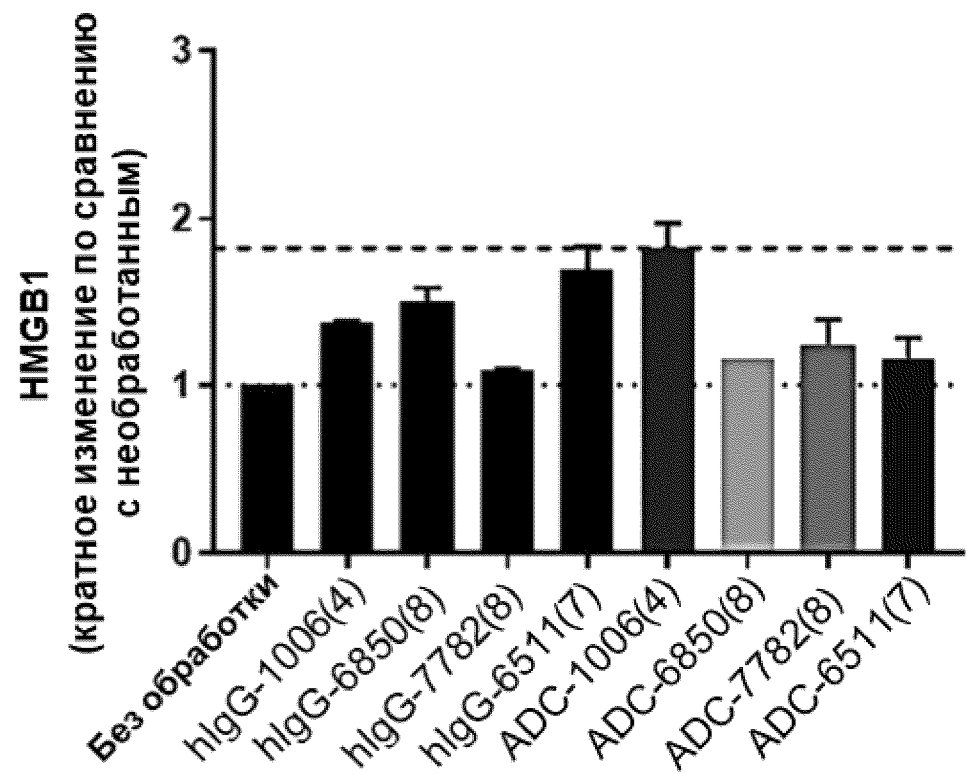


HMGB1

Фиг. 9А



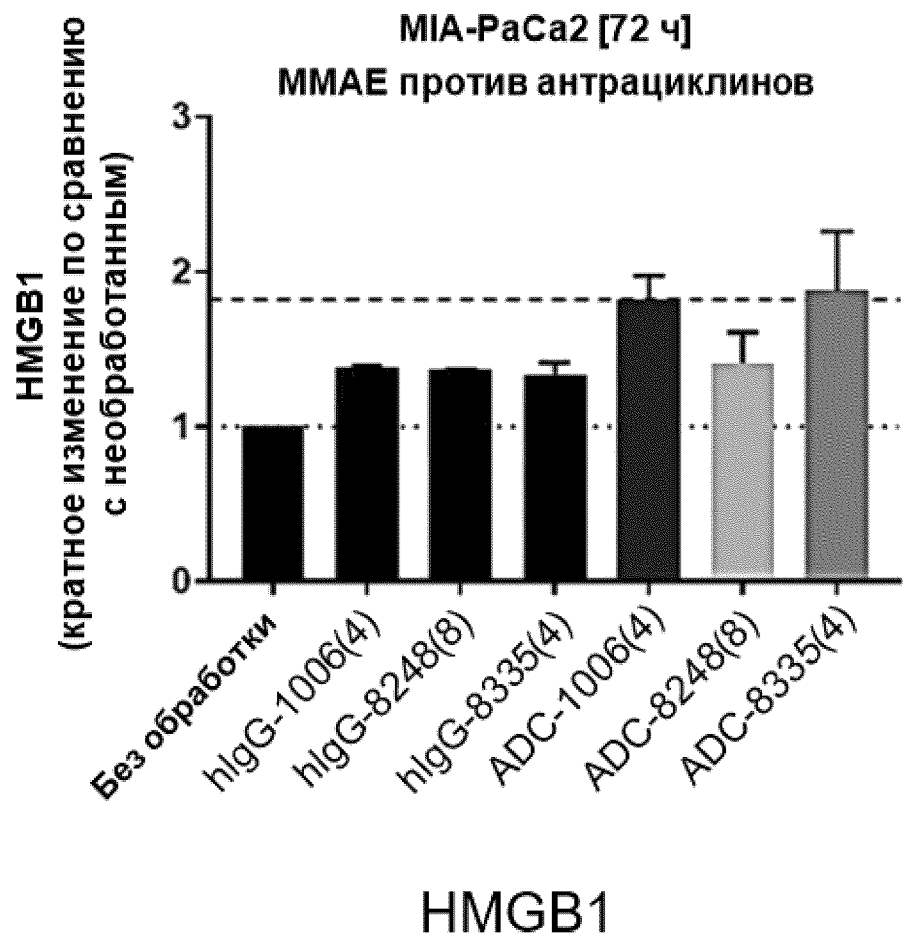
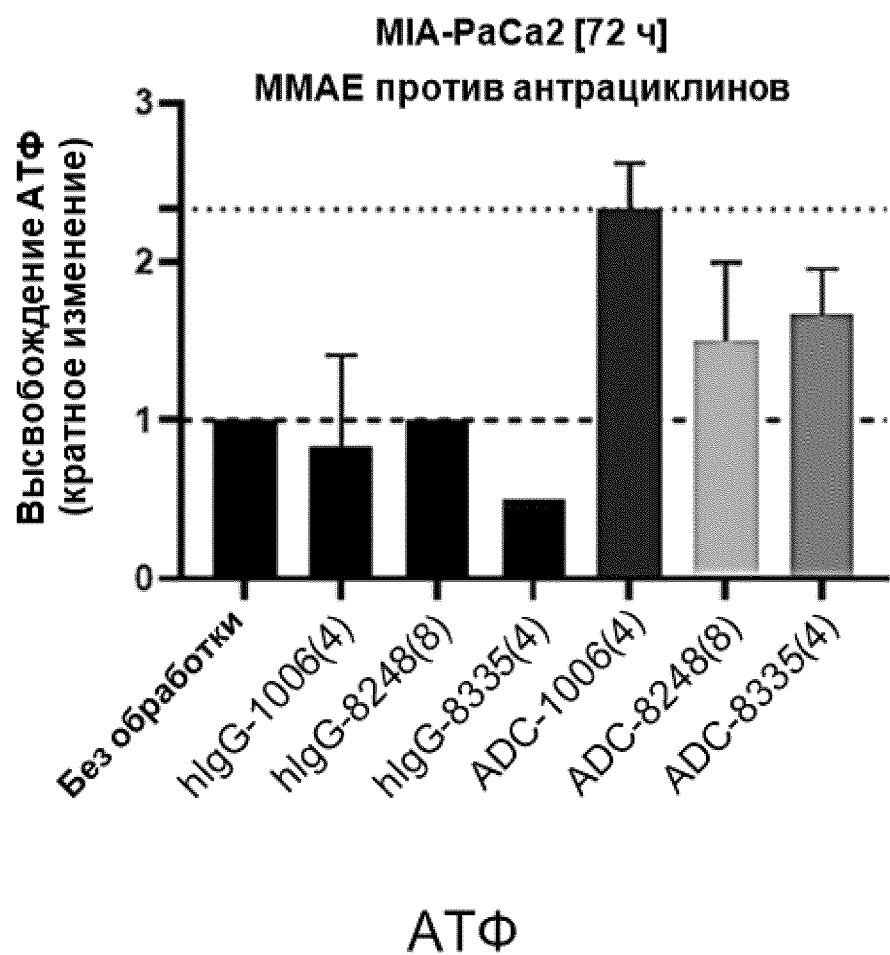
АТφ



HMGB1

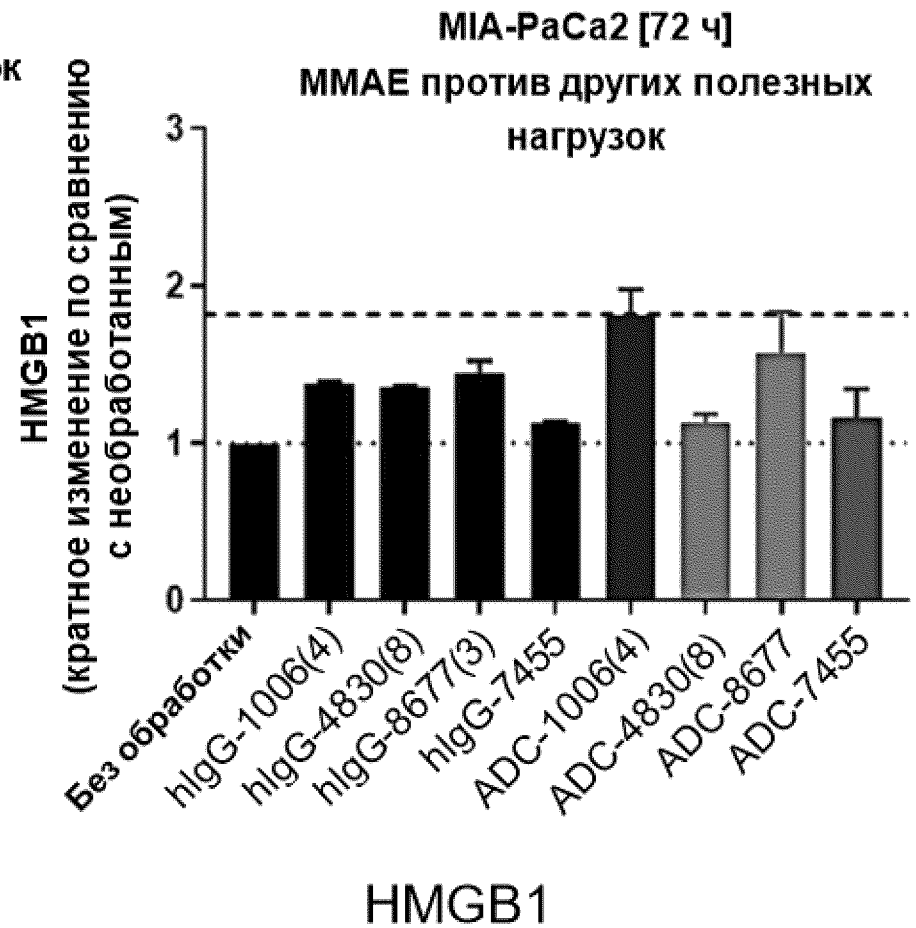
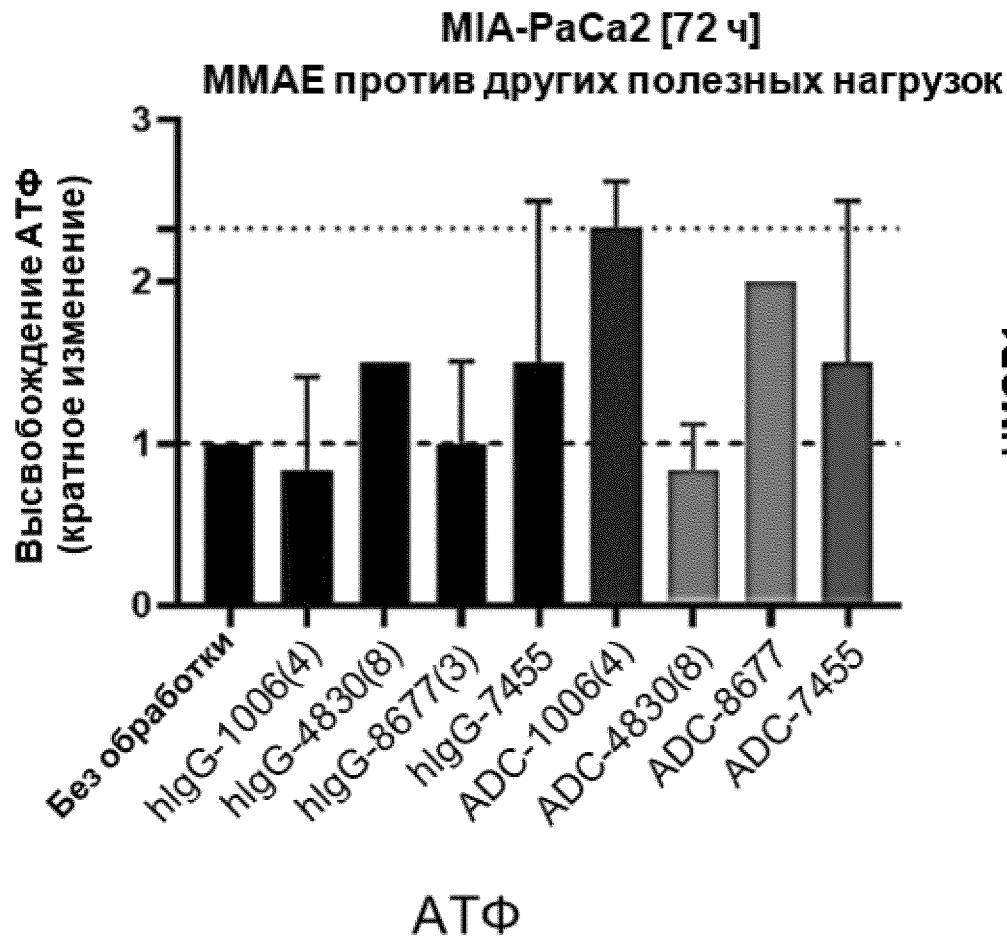
21/59

Фиг.9В



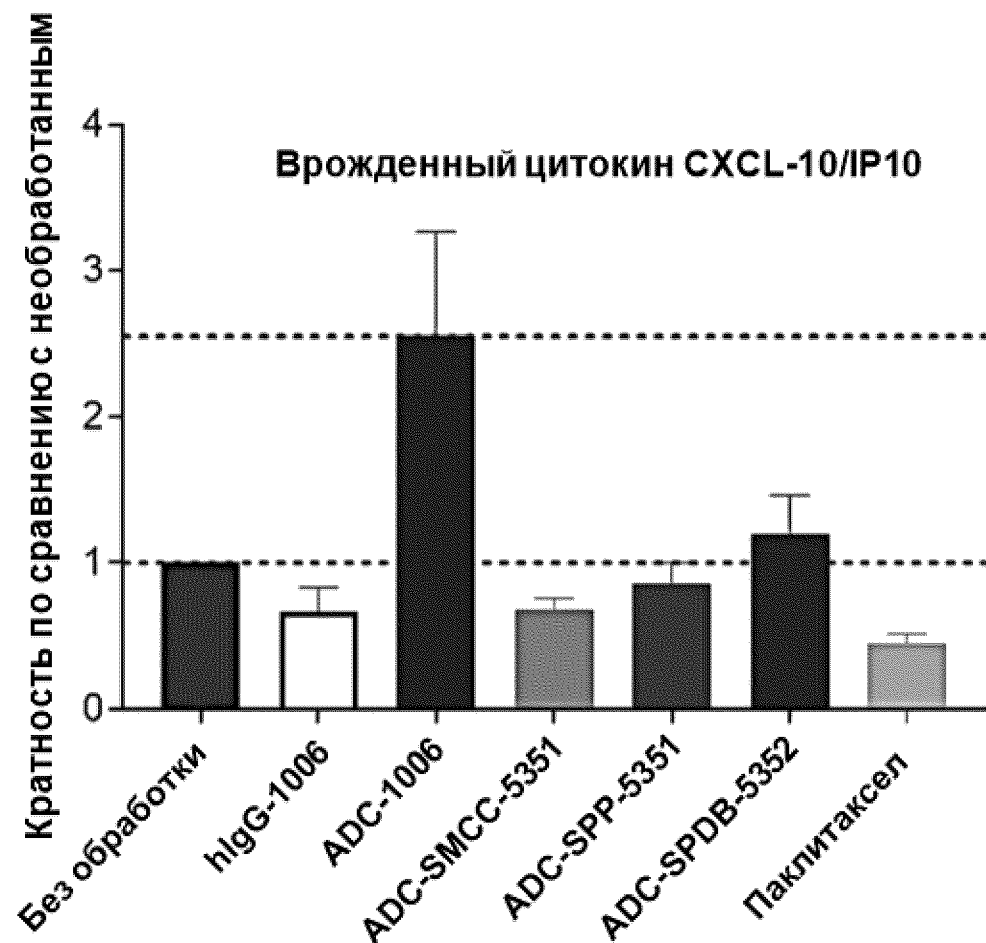
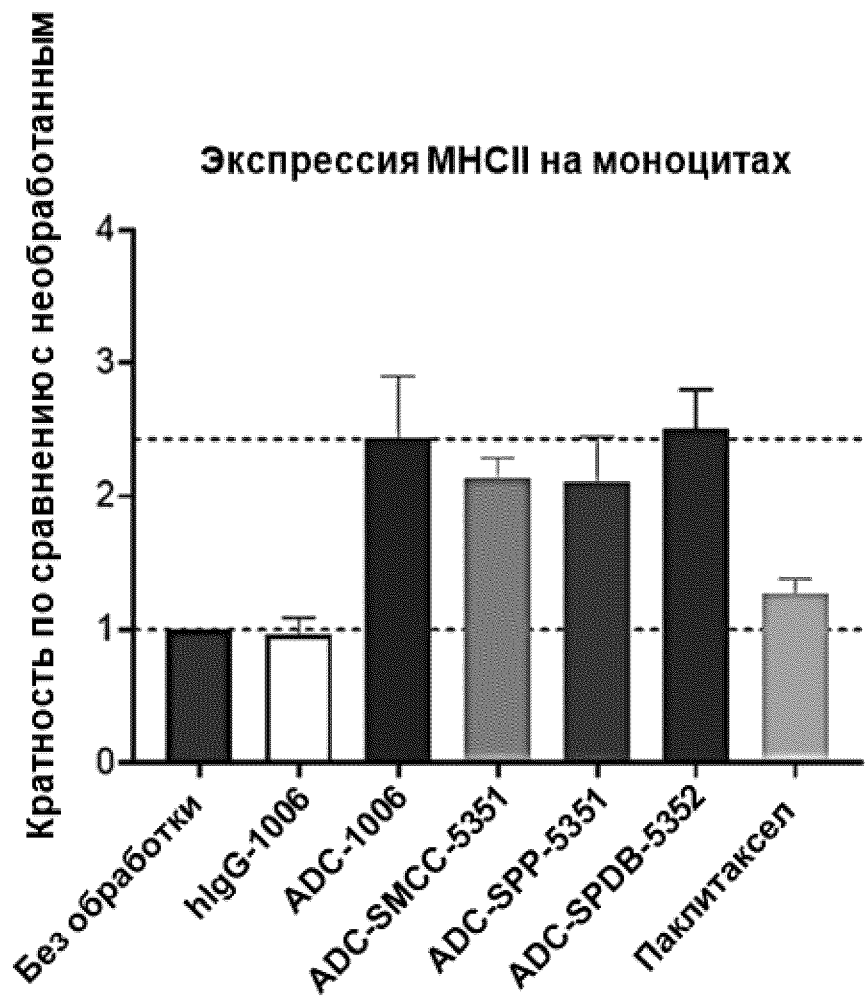
22/59

Фиг. 9С



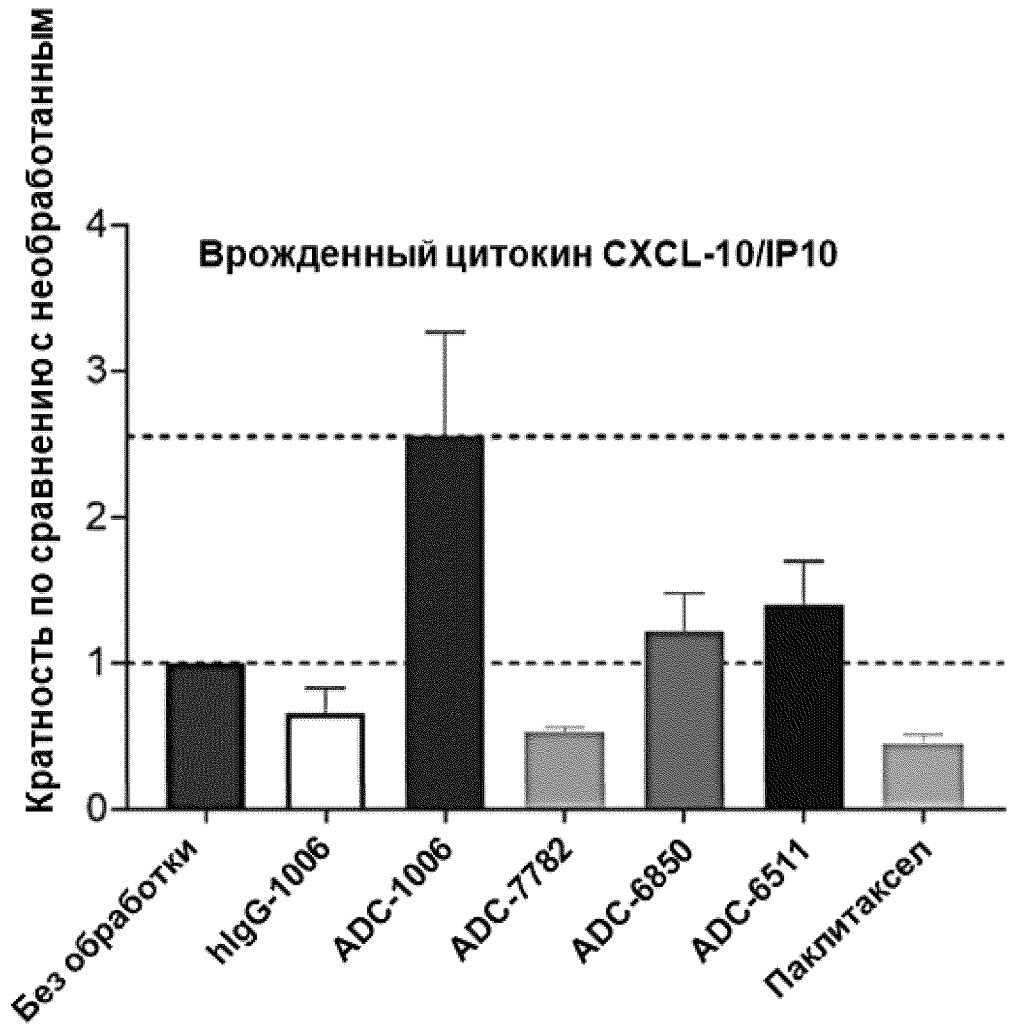
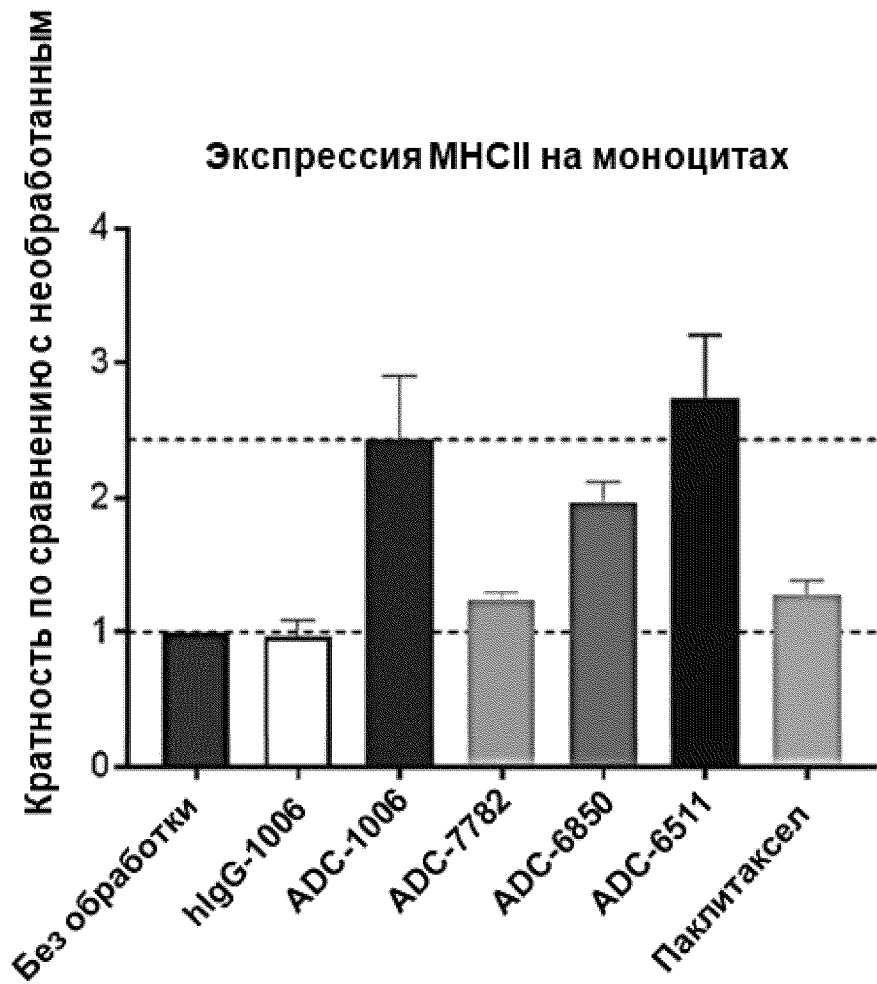
23/59

Фиг. 9D



24/59

Фиг. 10А

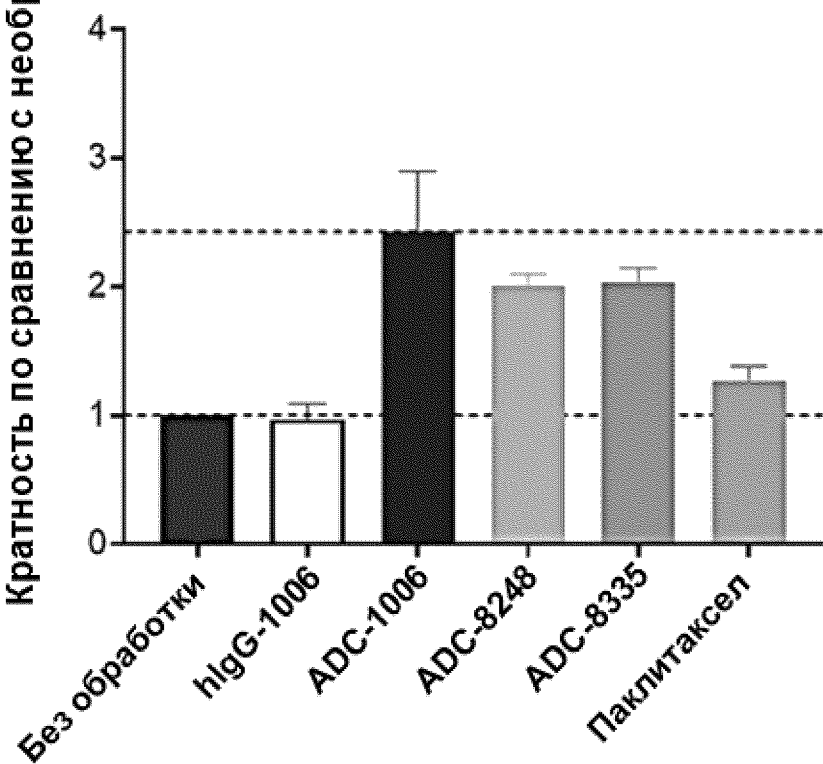


25/59

Фиг. 10В

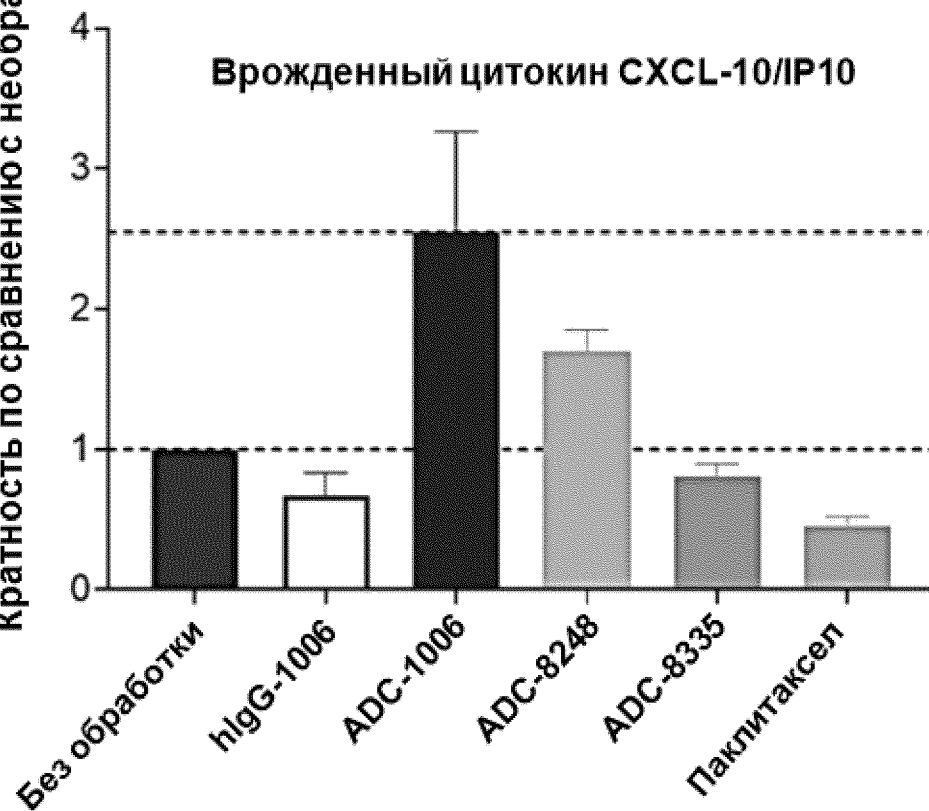
Кратность по сравнению с необработанным

Экспрессия МНСII на моноцитах



Кратность по сравнению с необработанным

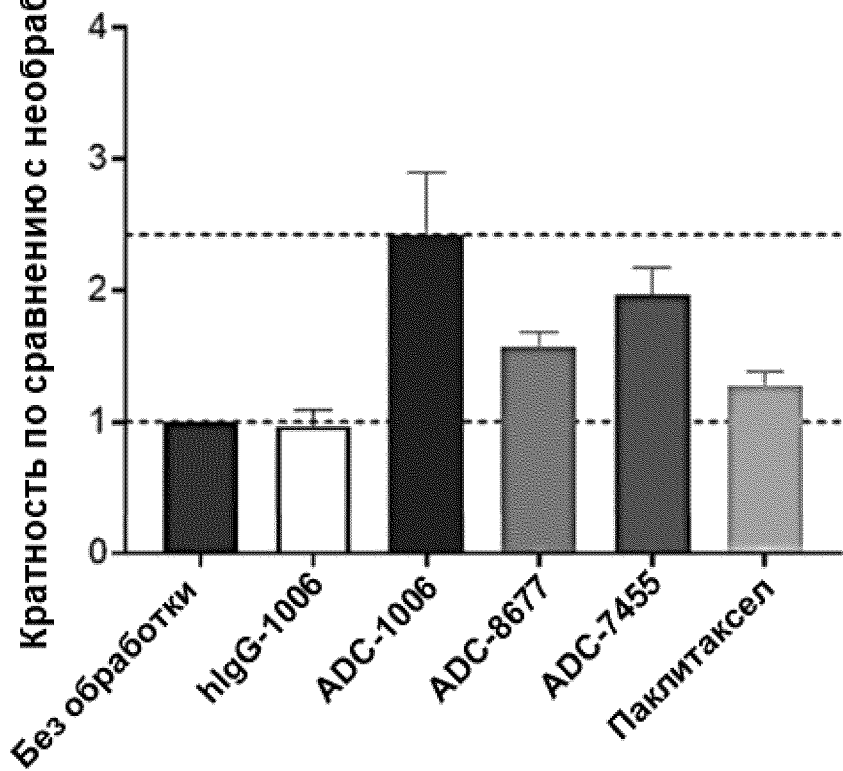
Врожденный цитокин CXCL-10/IP10



Фиг. 10С

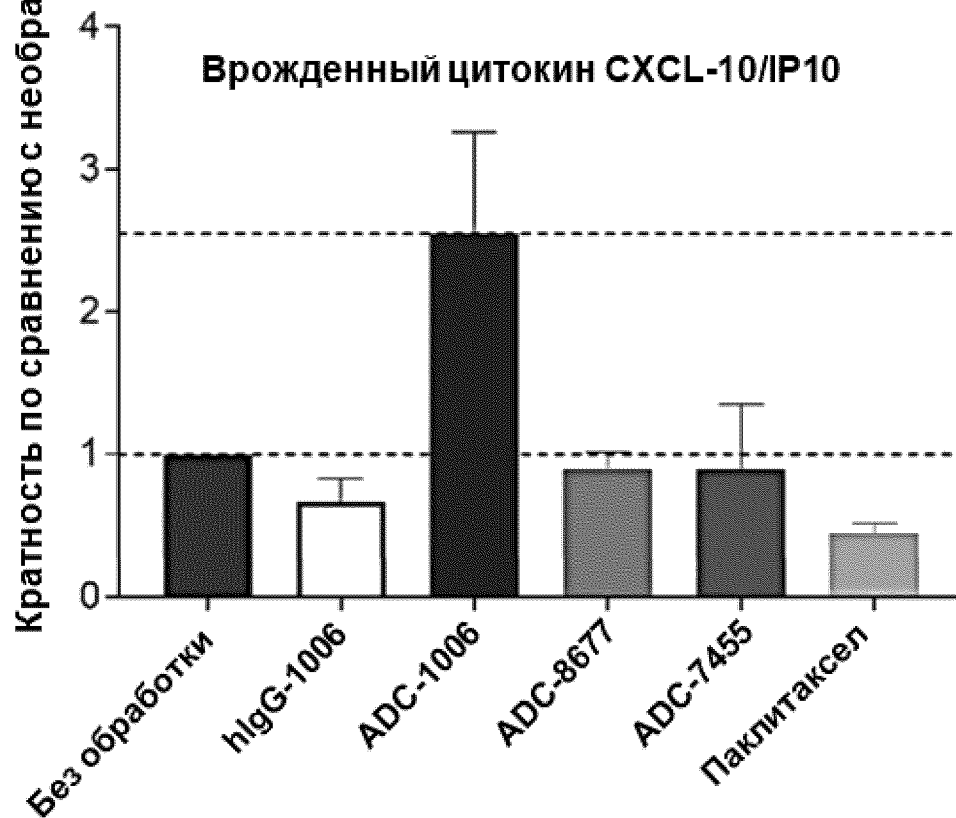
Кратность по сравнению с необработанным

Экспрессия МНСII на моноцитах

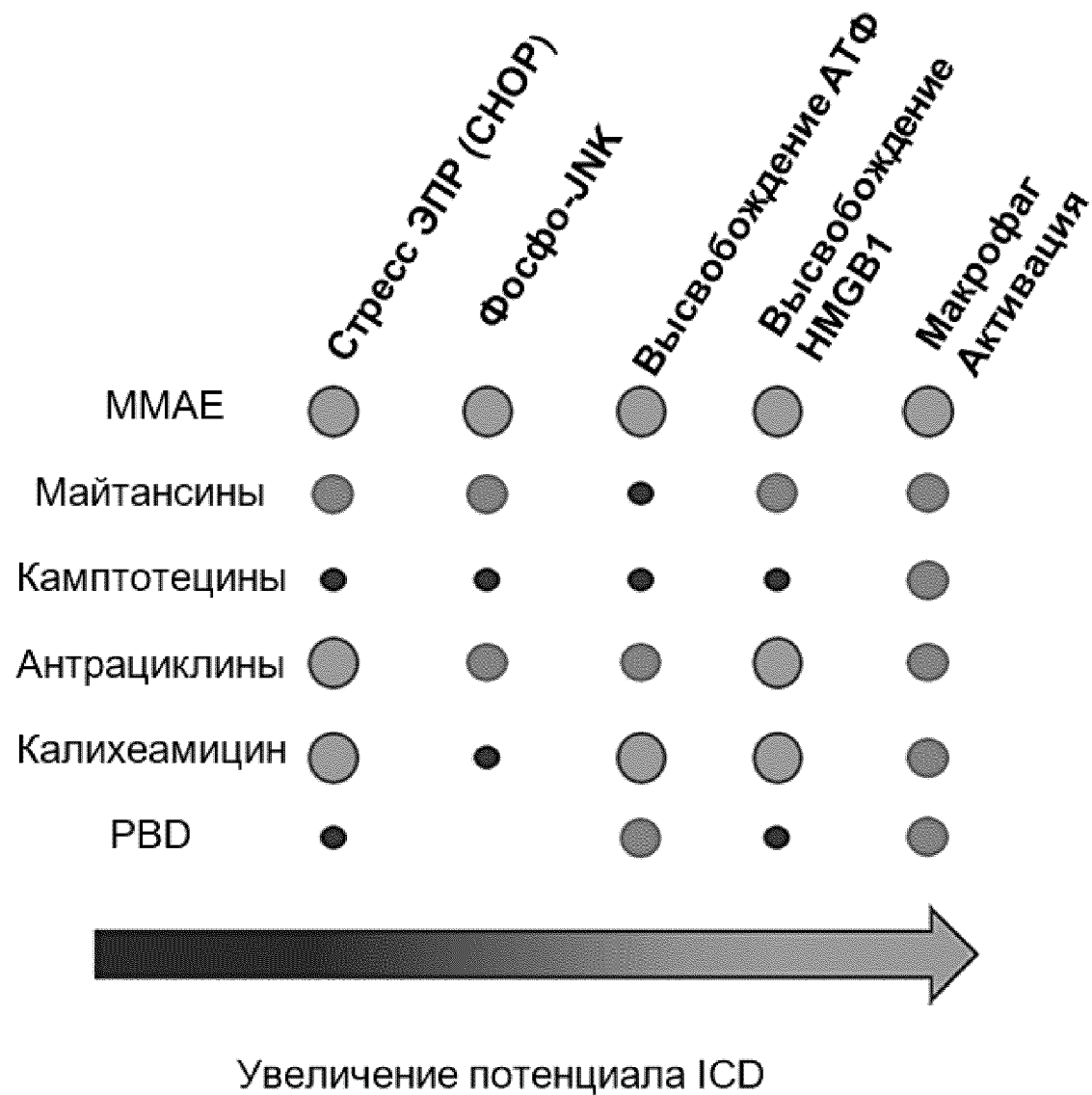


Кратность по сравнению с необработанным

Врожденный цитокин CXCL-10/IP10



Фиг. 10D

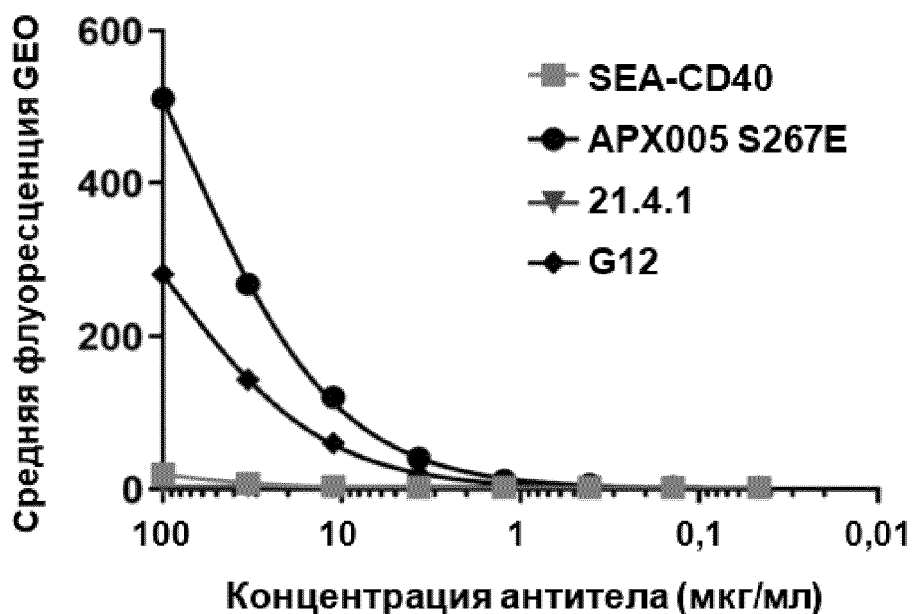


Фиг. 10Е

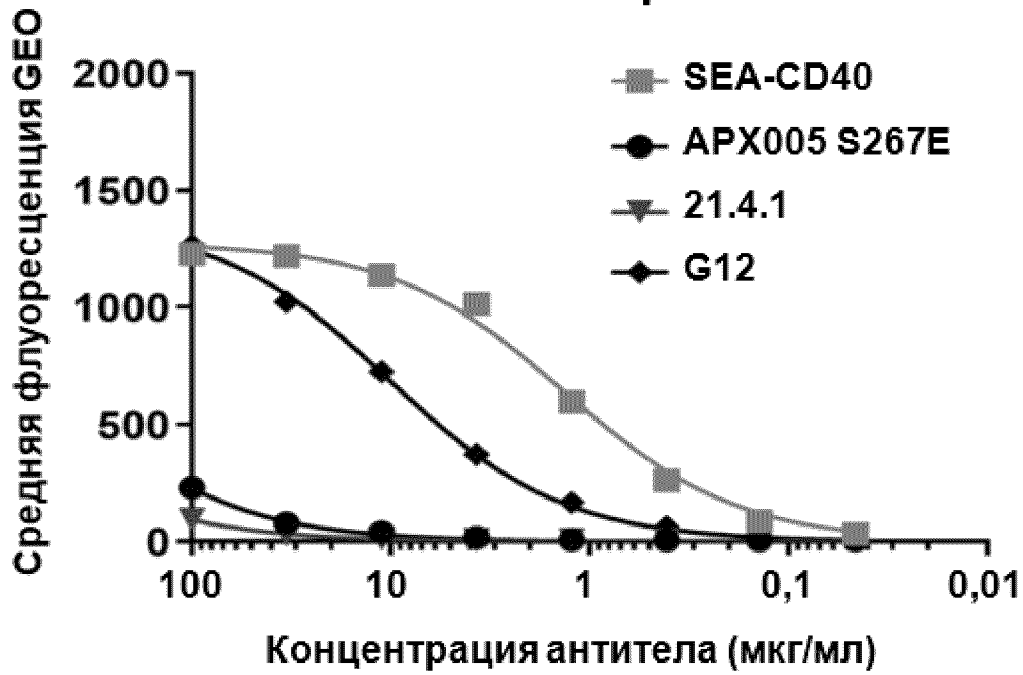
Анти-CD40 Антитело	SEA-CD40	APX005M	ADC-1013	Селикредумаб
Разработчик	Seagen	Apexigen	Alligator	Roche
Антитело Класс	Гуманизированный IgG1	Гуманизированное кроличье IgG1	Полностью человеческое IgG1	Полностью человеческое IgG2
каркас Fc модификация	↑FcγRIIIa PATU8988S	↑связывание FcγRIIIa&b ↓ связывание FcγRIIIa&b	Нативная	Нативная
Исходное антитело / источник	дацетузумаб	Патент США № 9676861B2	Корейская заявка № 20170041790	Салп. <i>Immunol. Res.</i> , 2015, 3:236
Антитело, используемое для активности	SEA-CD40	APX005M S267E	G12	21.4.1

Фиг. 11А

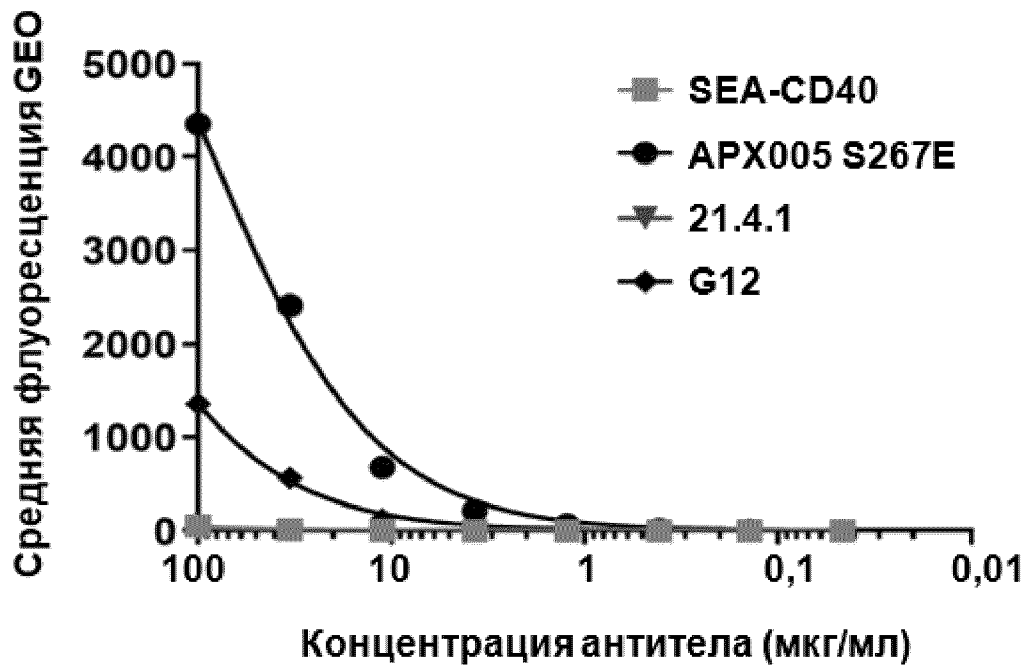
Связывание с FcγRIIIa



Фиг. 11В

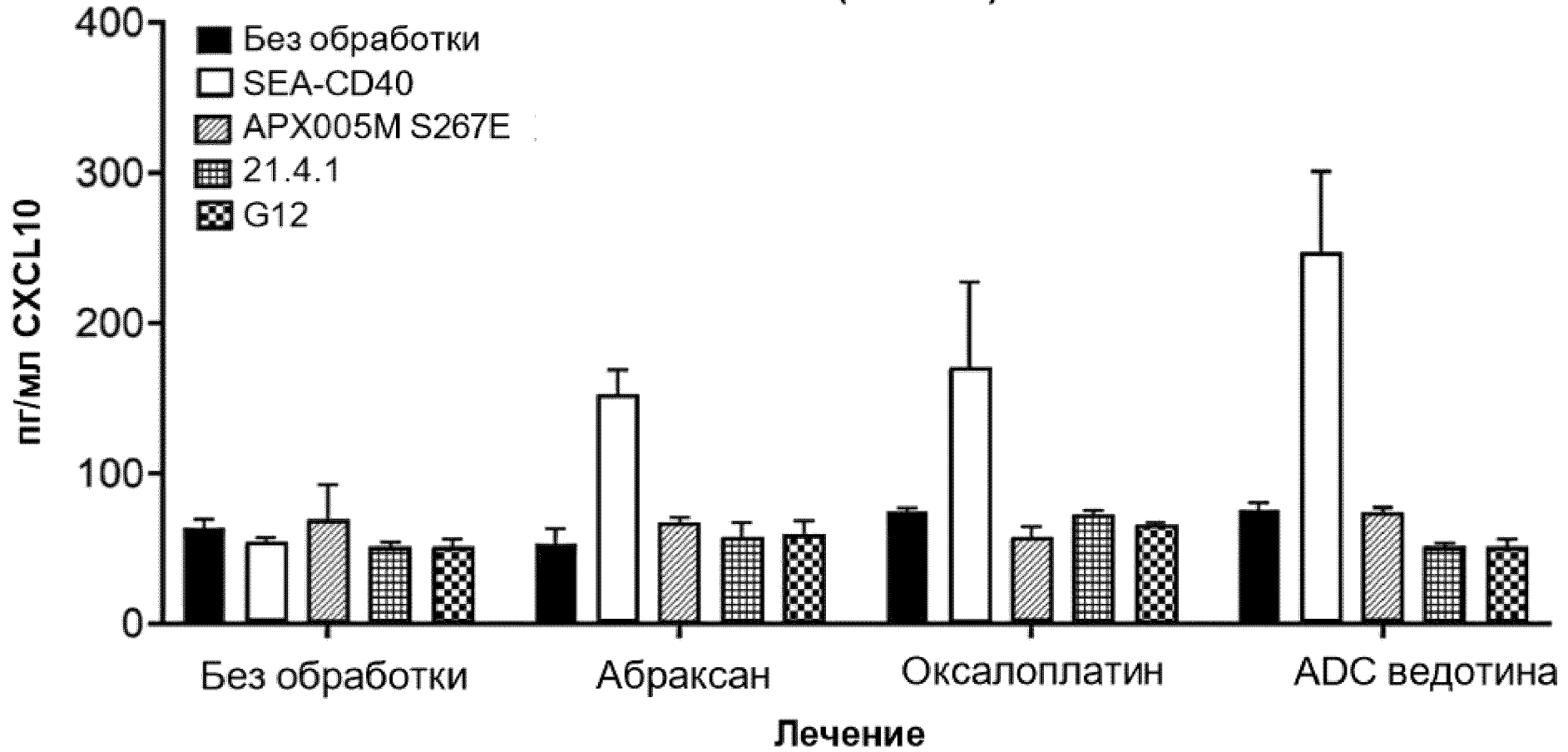
Связывание с Fc γ RIIIa

Фиг. 11C

Связывание с Fc γ RIIb

Фиг. 11D

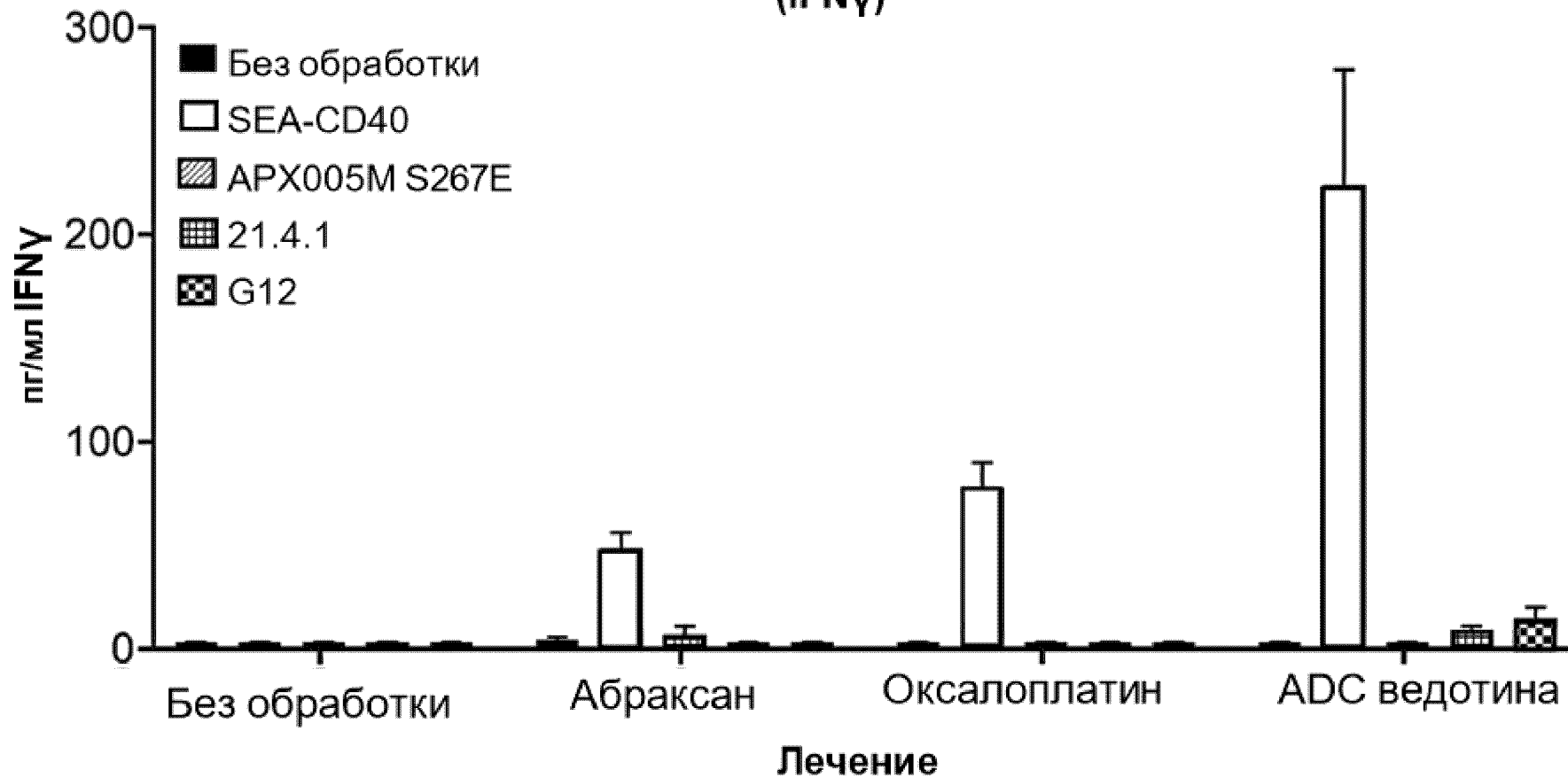
Агонисты CD40 + химиотерапия
(CXCL10)



31/59

Фиг. 12А

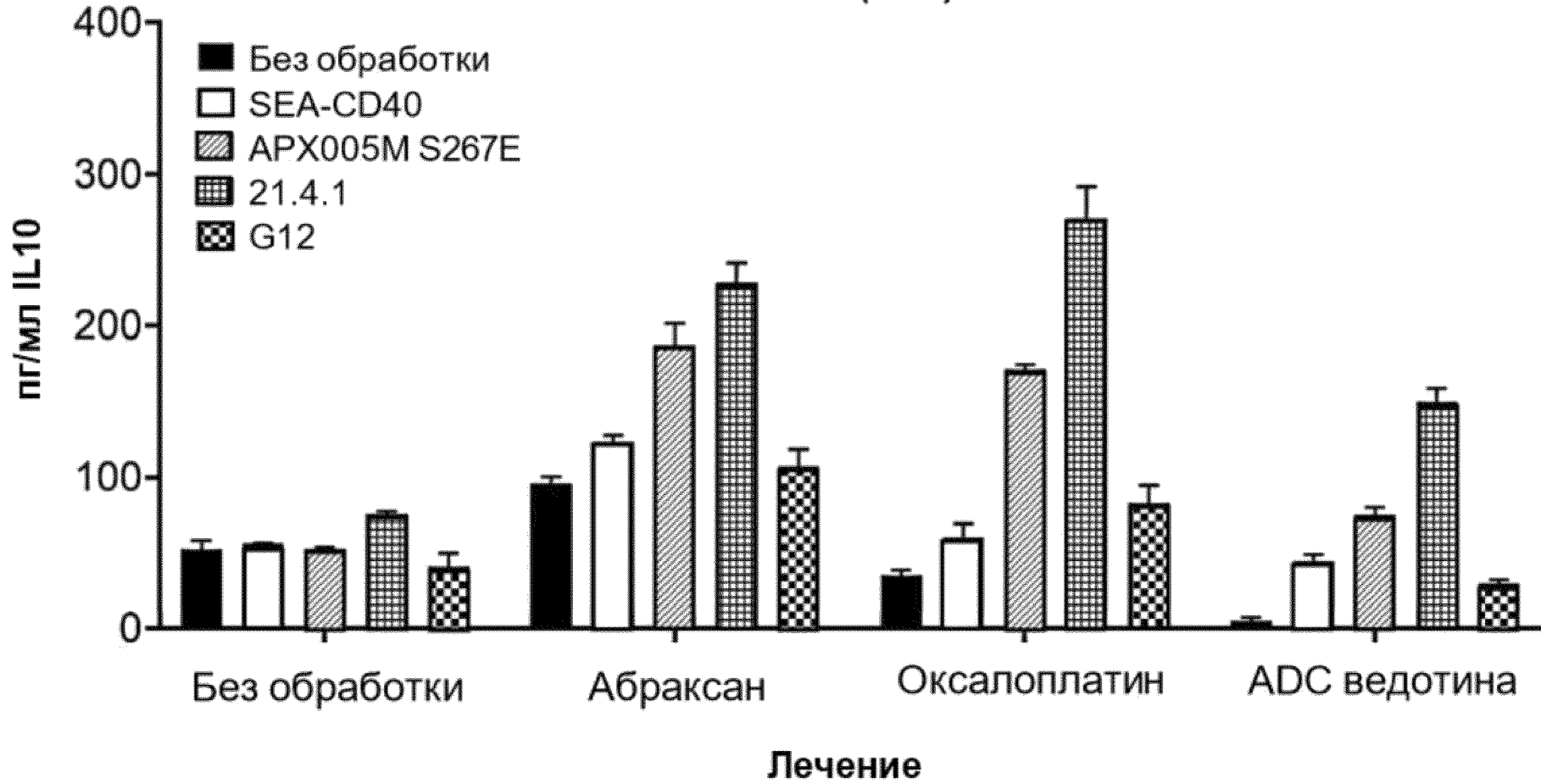
Агонисты CD40 + химиотерапия
(IFN γ)



32/59

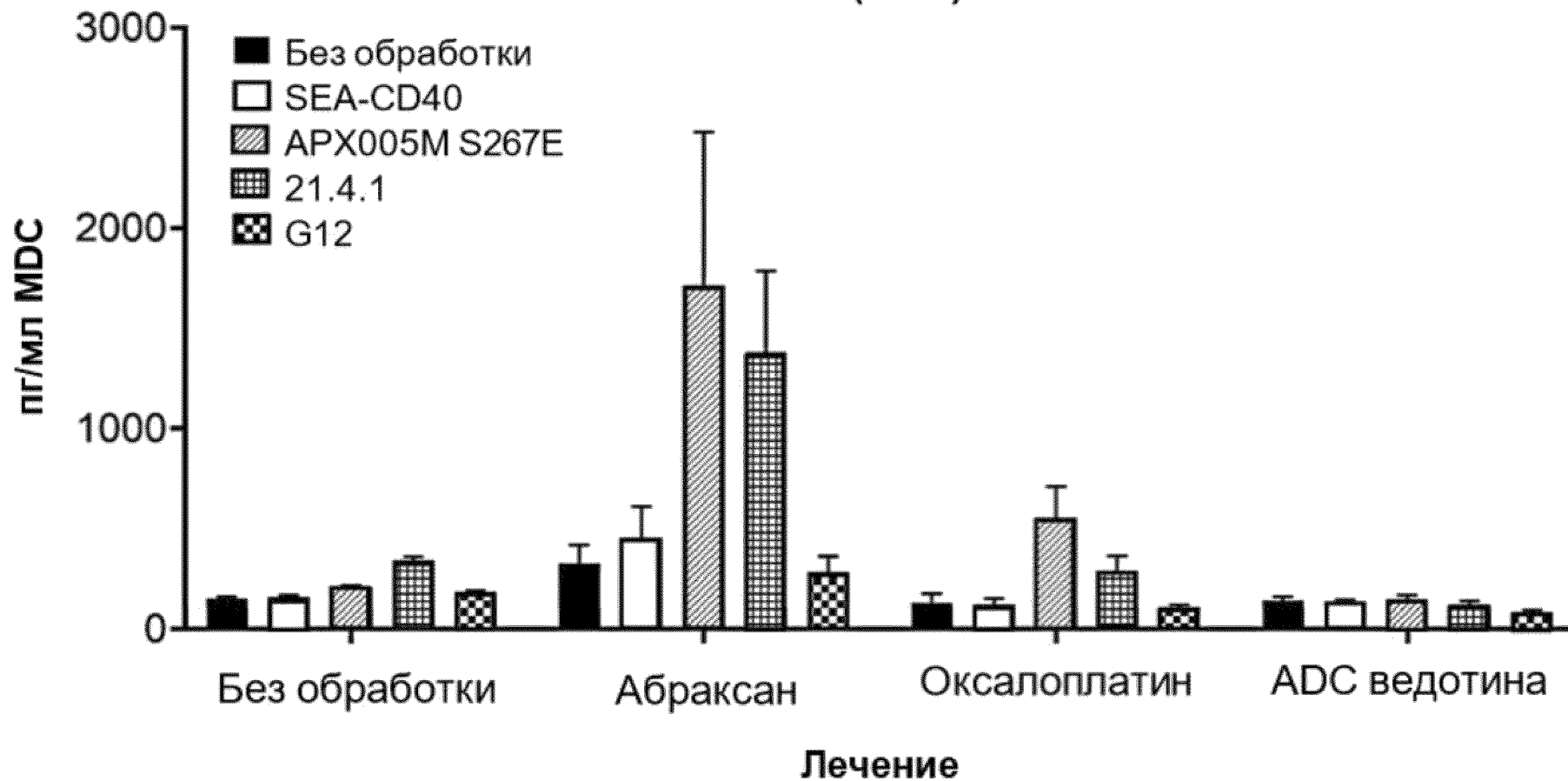
Фиг. 12В

Агонисты CD40 + химиотерапия
(IL10)



Фиг. 12С

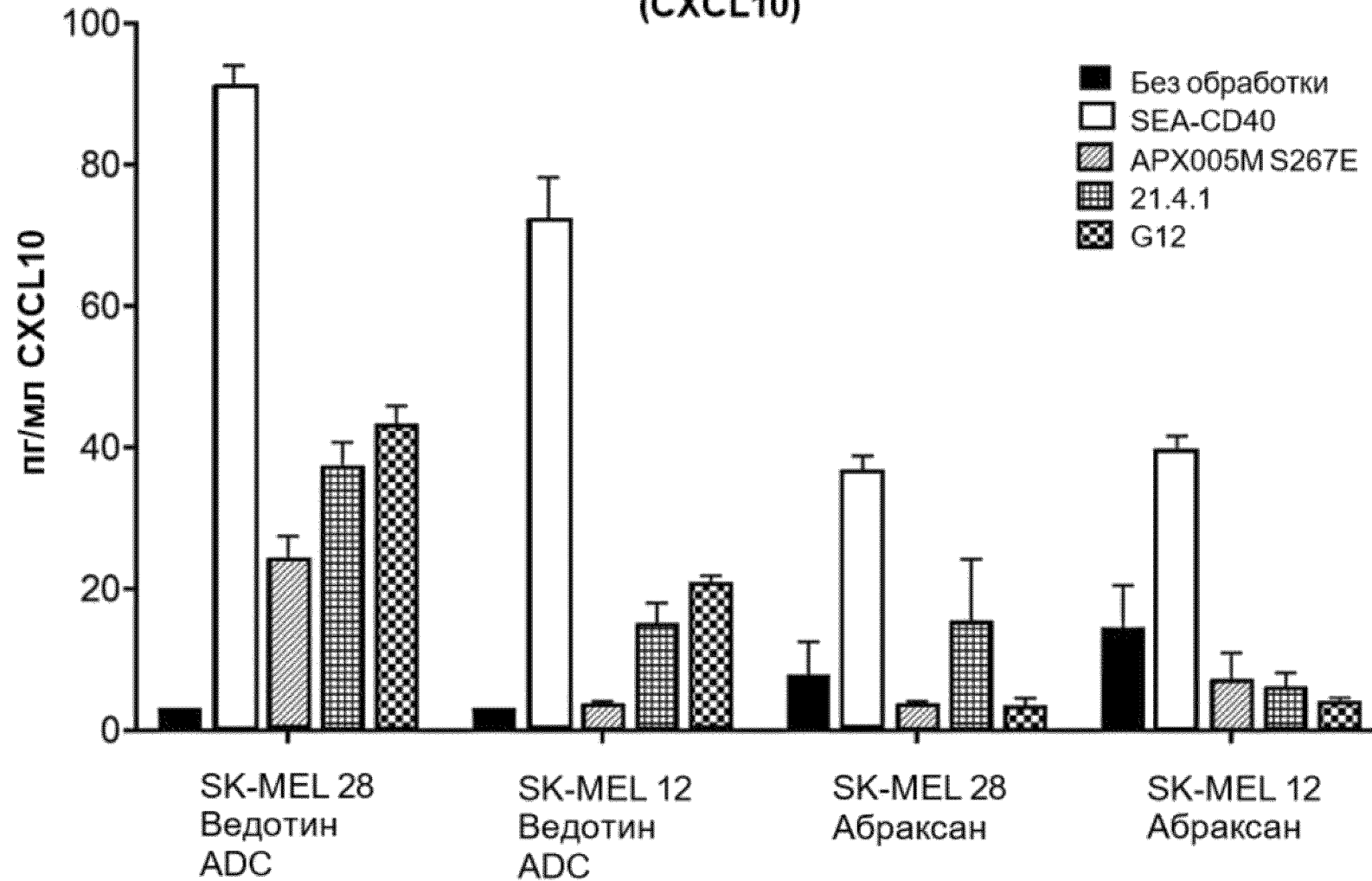
Агонисты CD40 + химиотерапия (MDC)



34/59

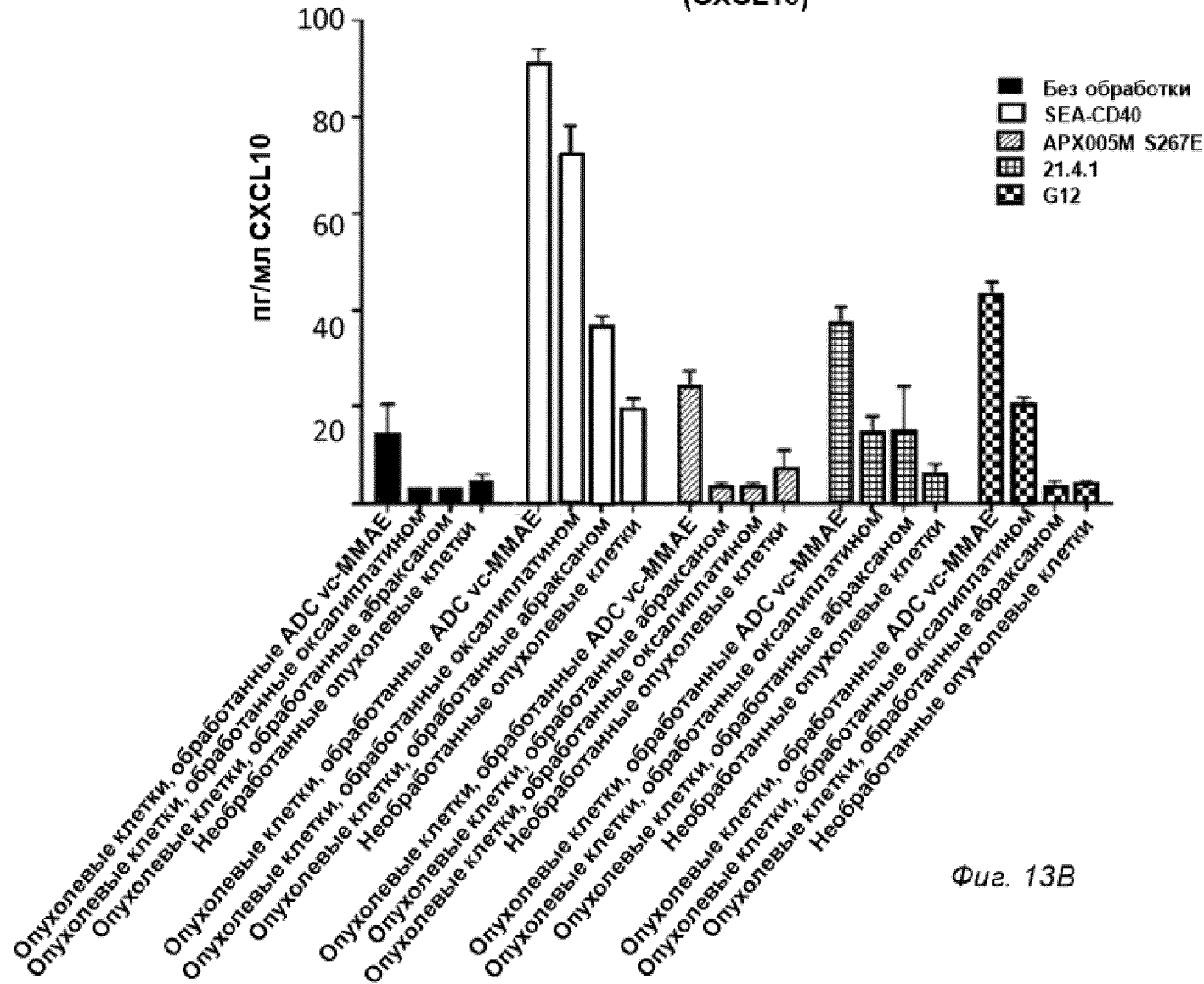
Фиг. 12D

Агонисты CD40 + химиотерапия
(CXCL10)



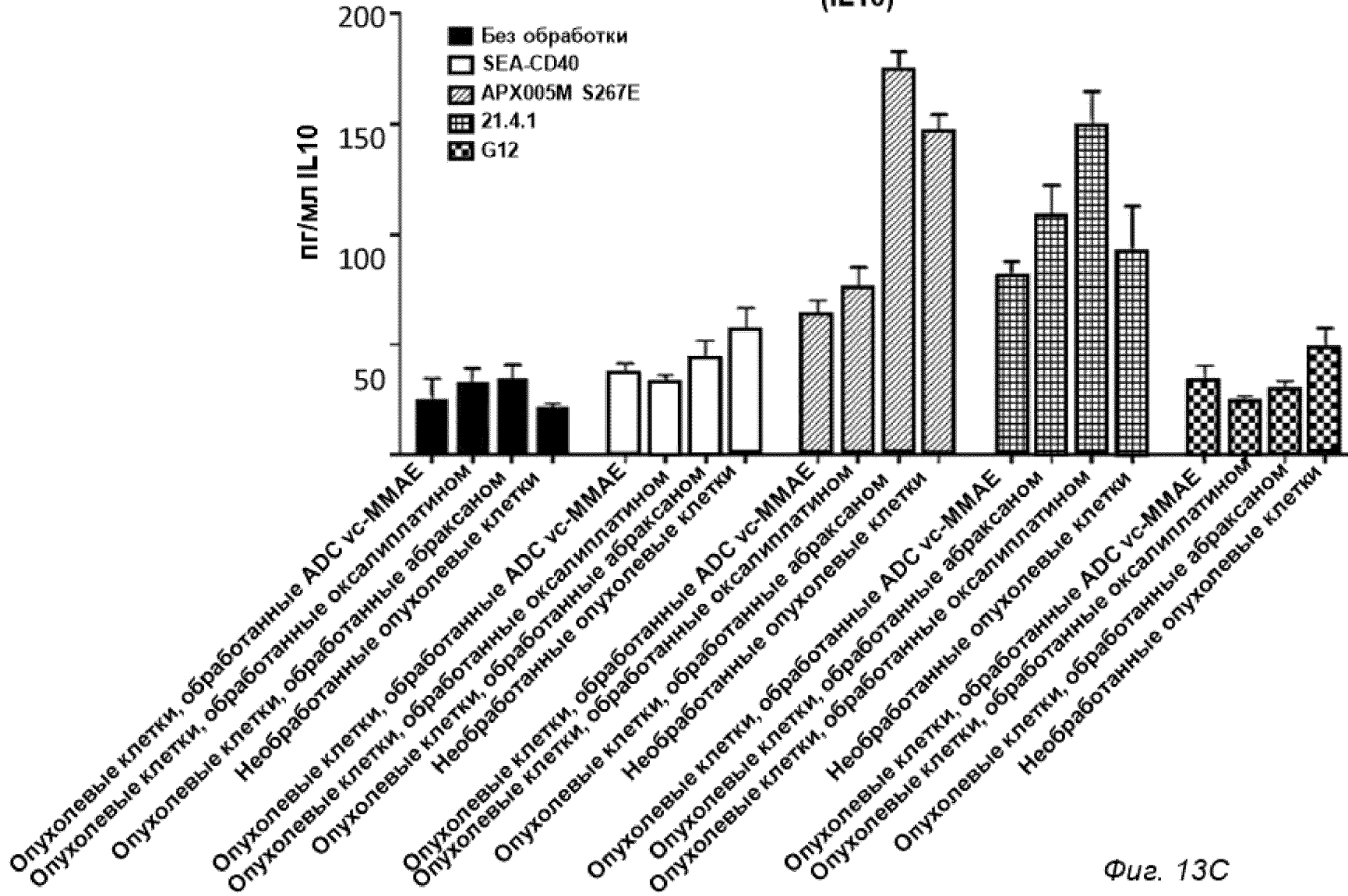
Фиг. 13А

Агонисты CD40 + химиотерапия
(CXCL10)

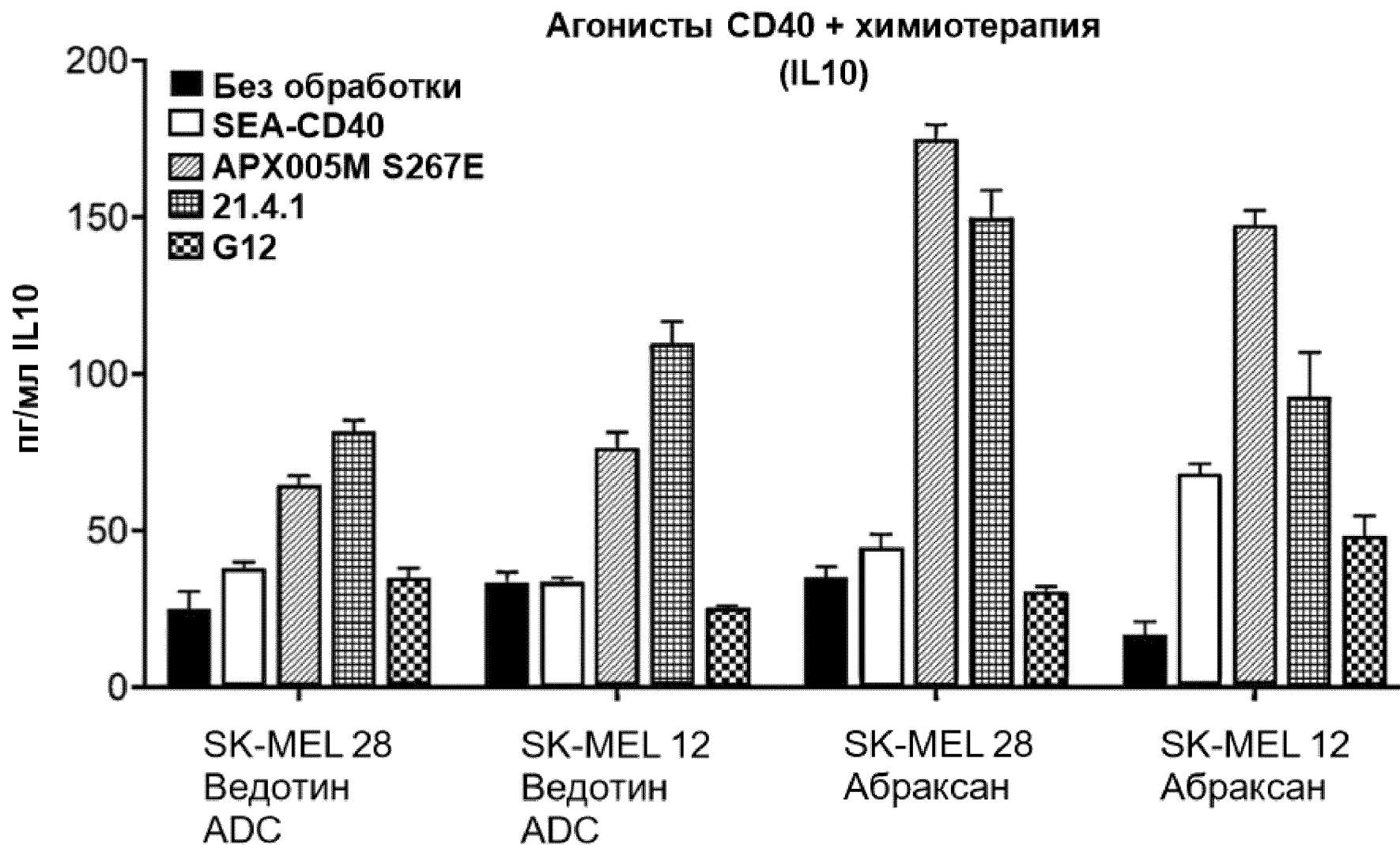


Фиг. 13В

Агонисты CD40 + химиотерапия
(IL10)



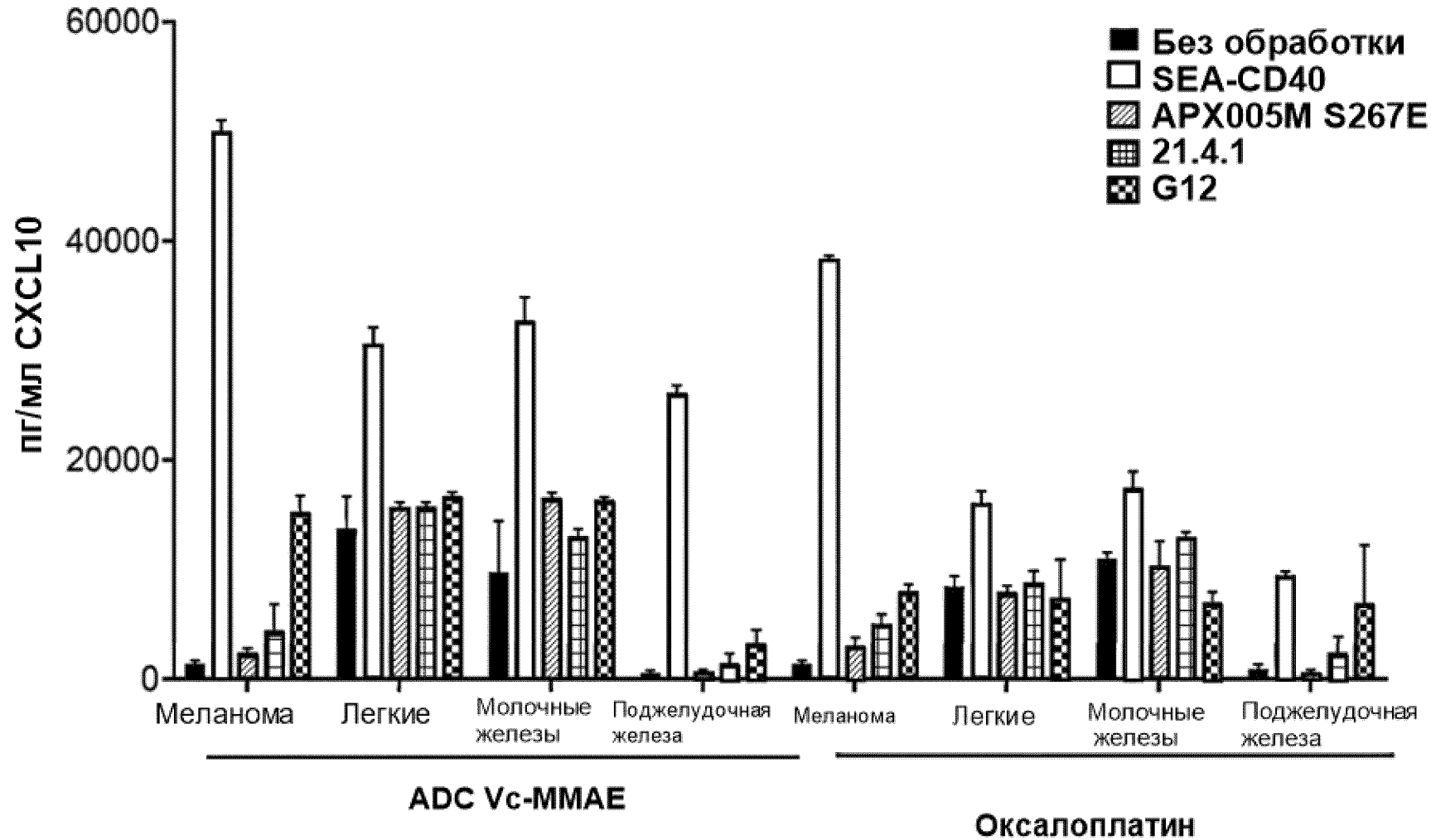
Фиг. 13С



38/59

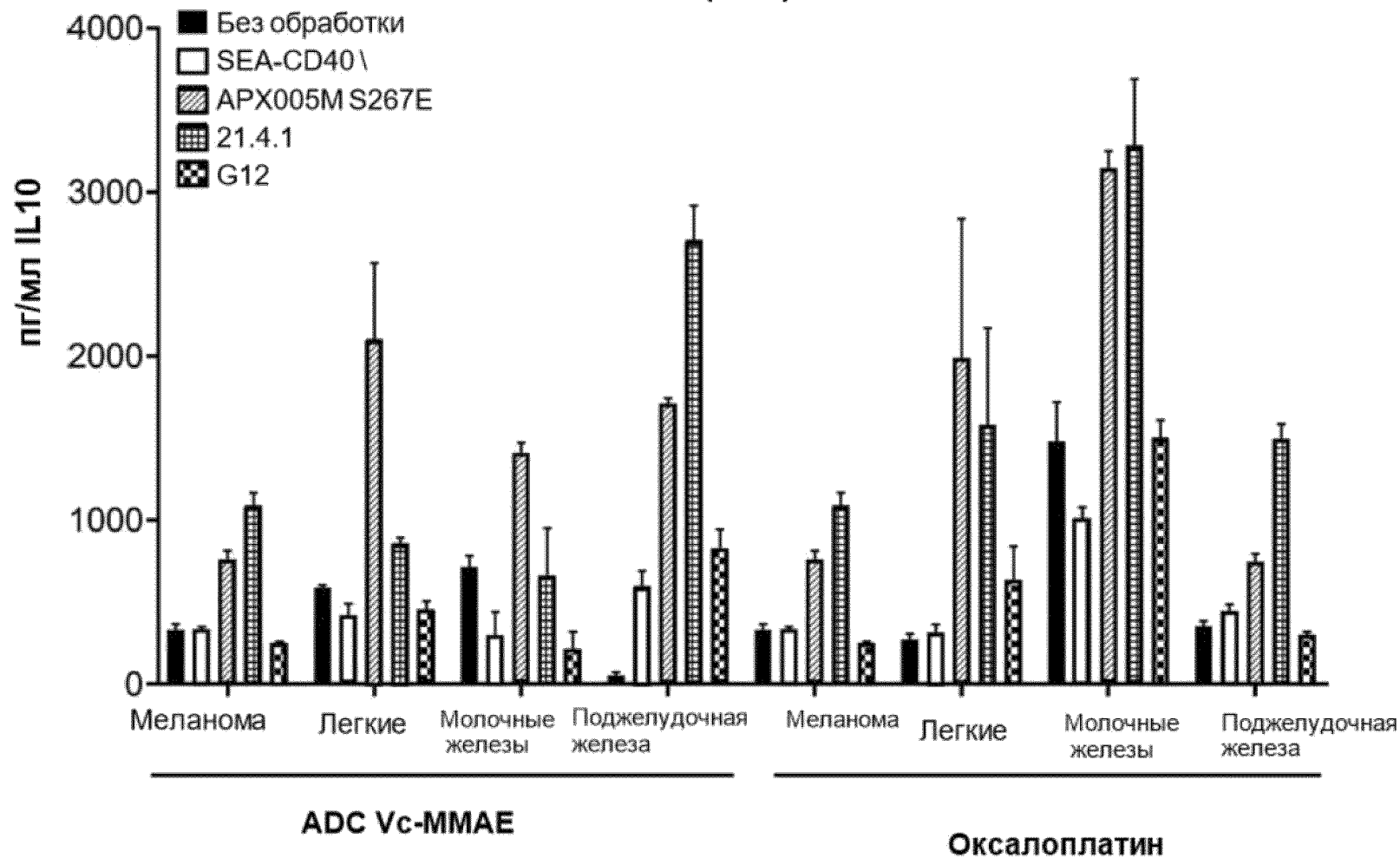
Фиг. 13D

SEA-CD40+ агент ICD
(CXCL10)



Фиг. 14А

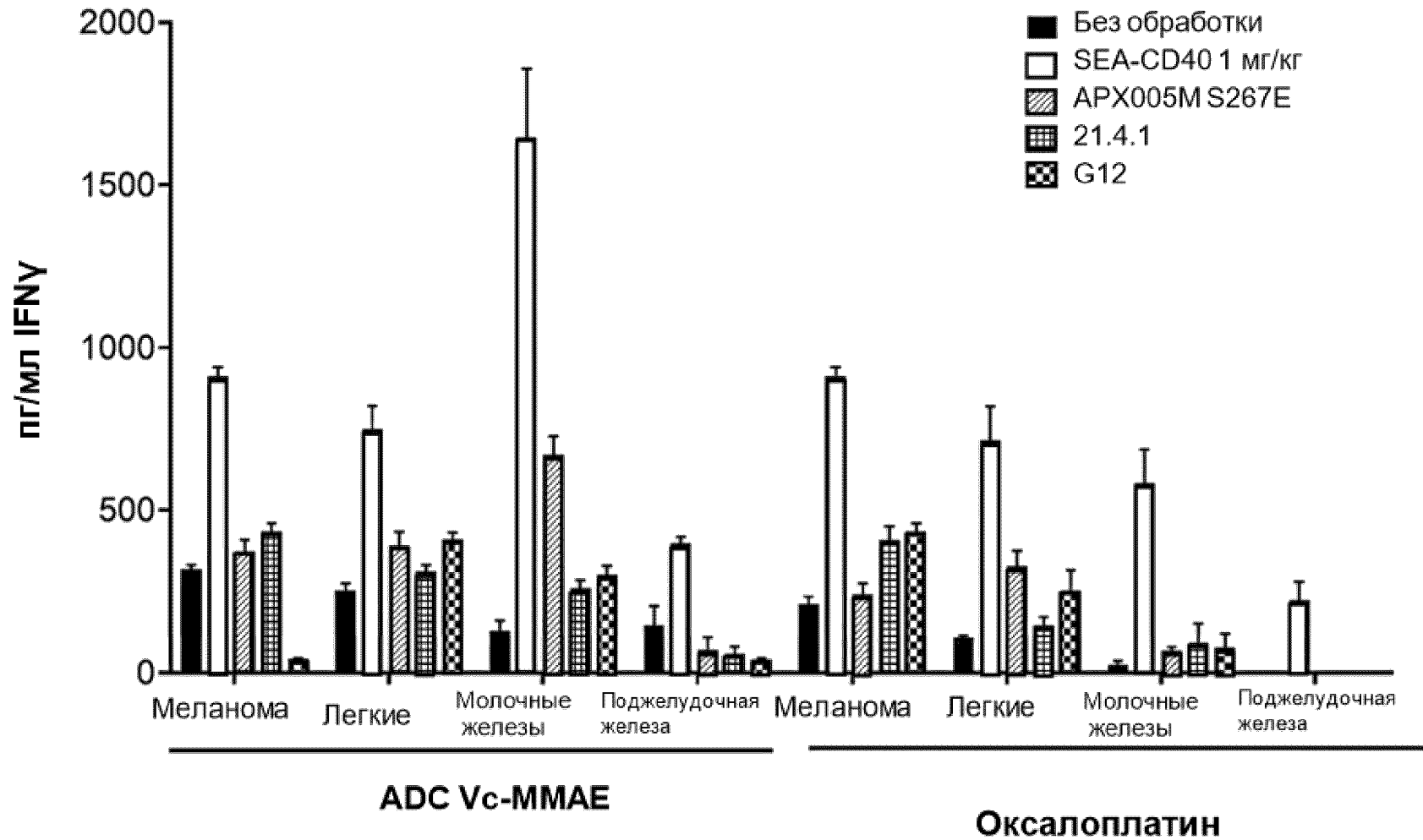
**Агонист CD40 + агенты ICD
(IL10)**



40/59

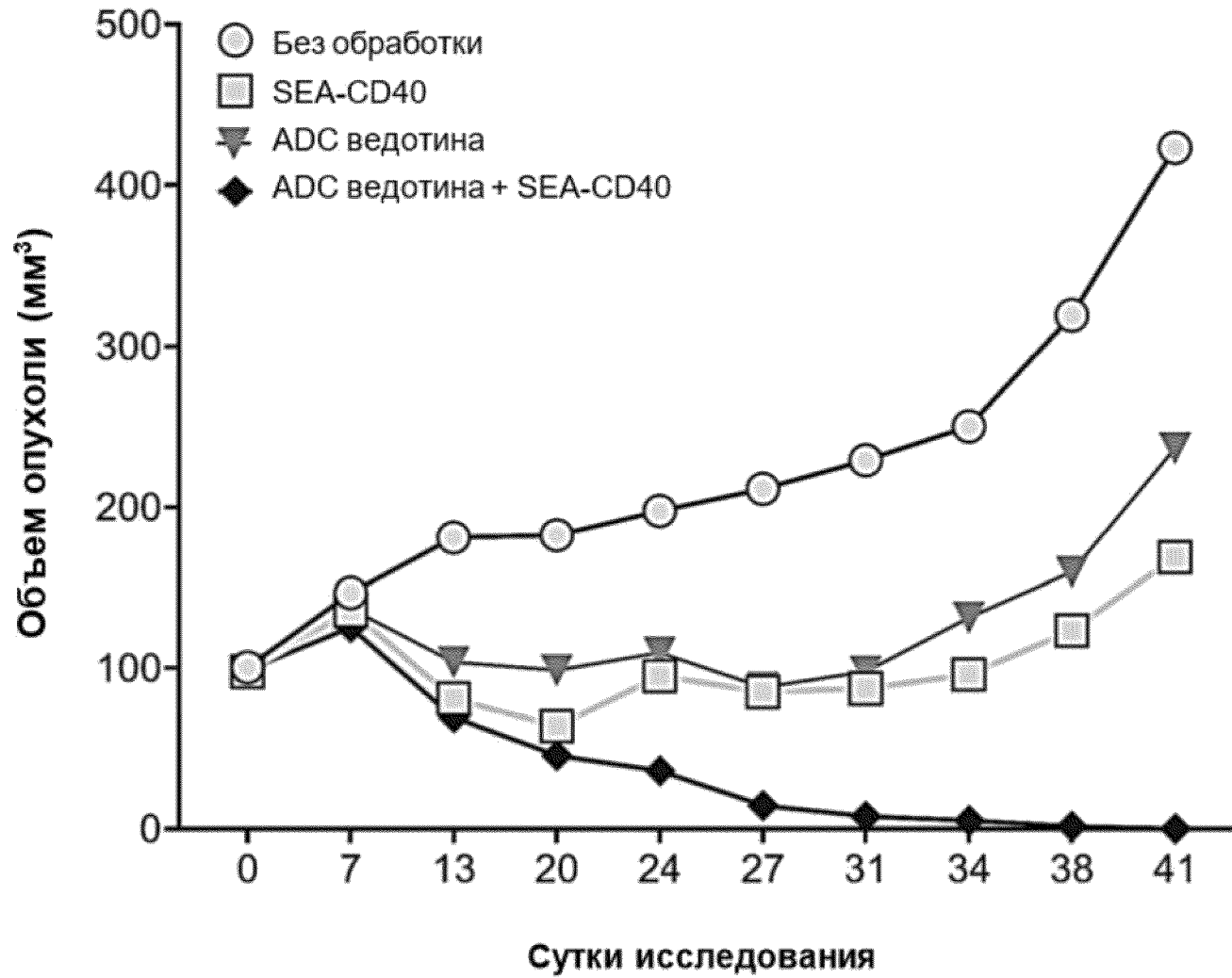
Фиг. 14В

Агонист CD40 + агенты ICD
(IFN γ)



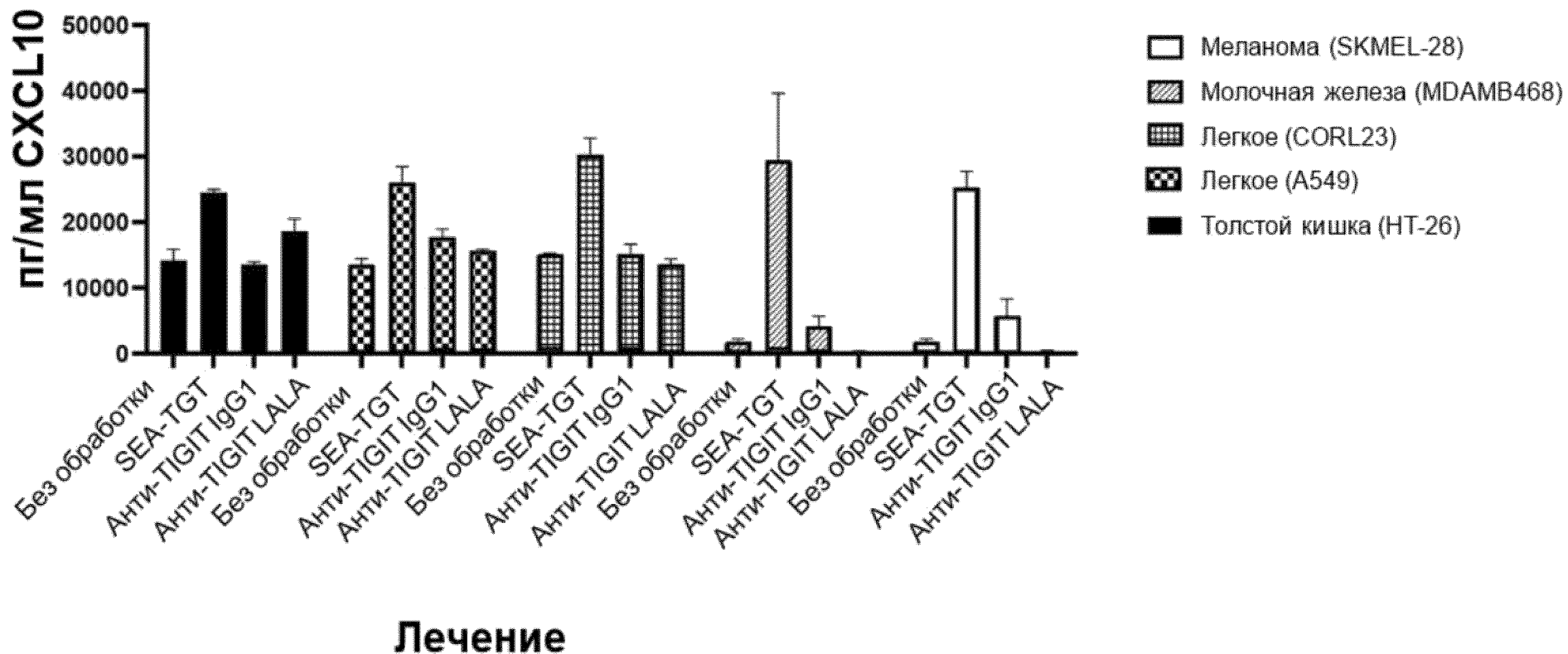
Фиг. 14С

Комбинация химиотерапии SEA-CD40 ADC ведотина

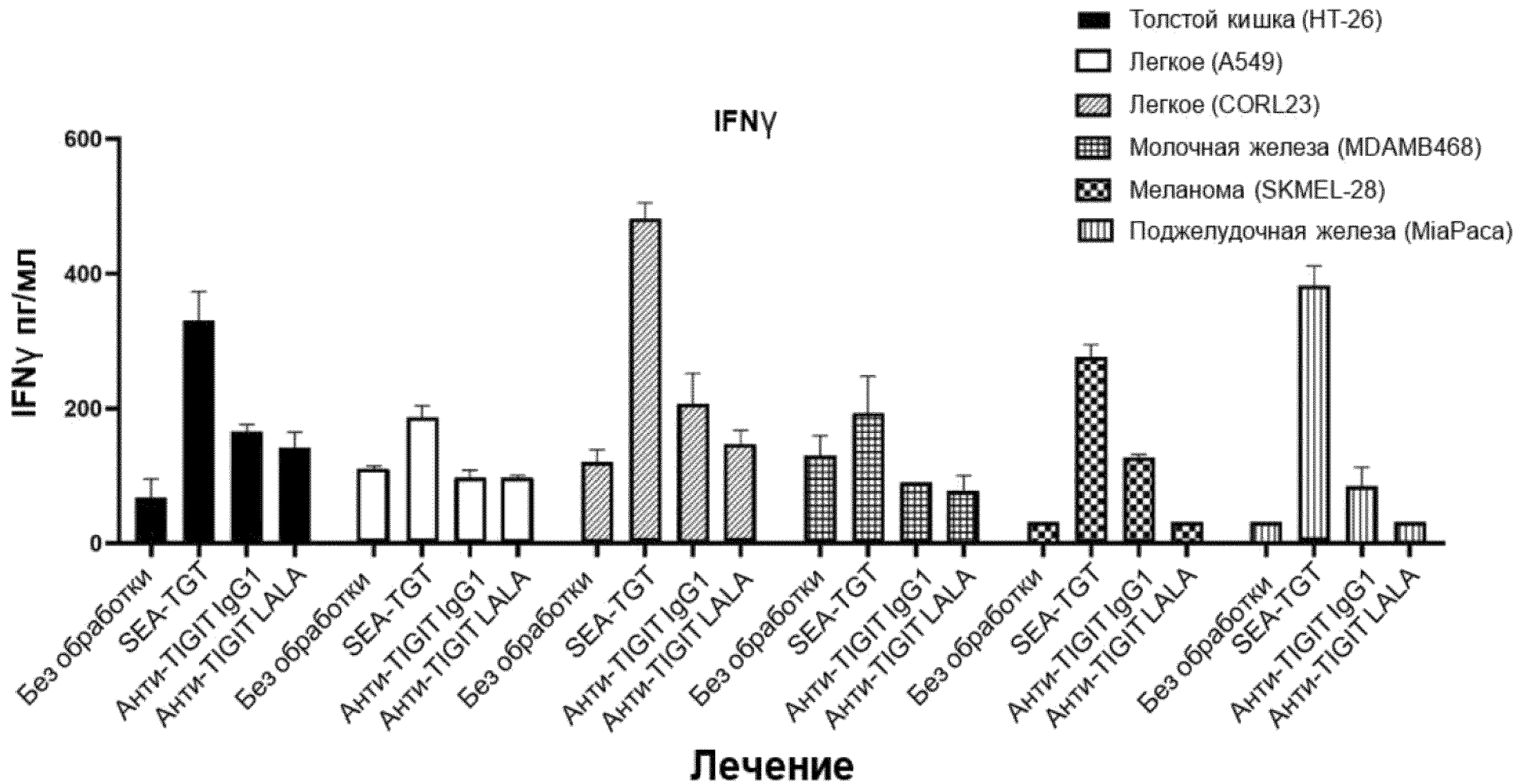


Фиг. 15

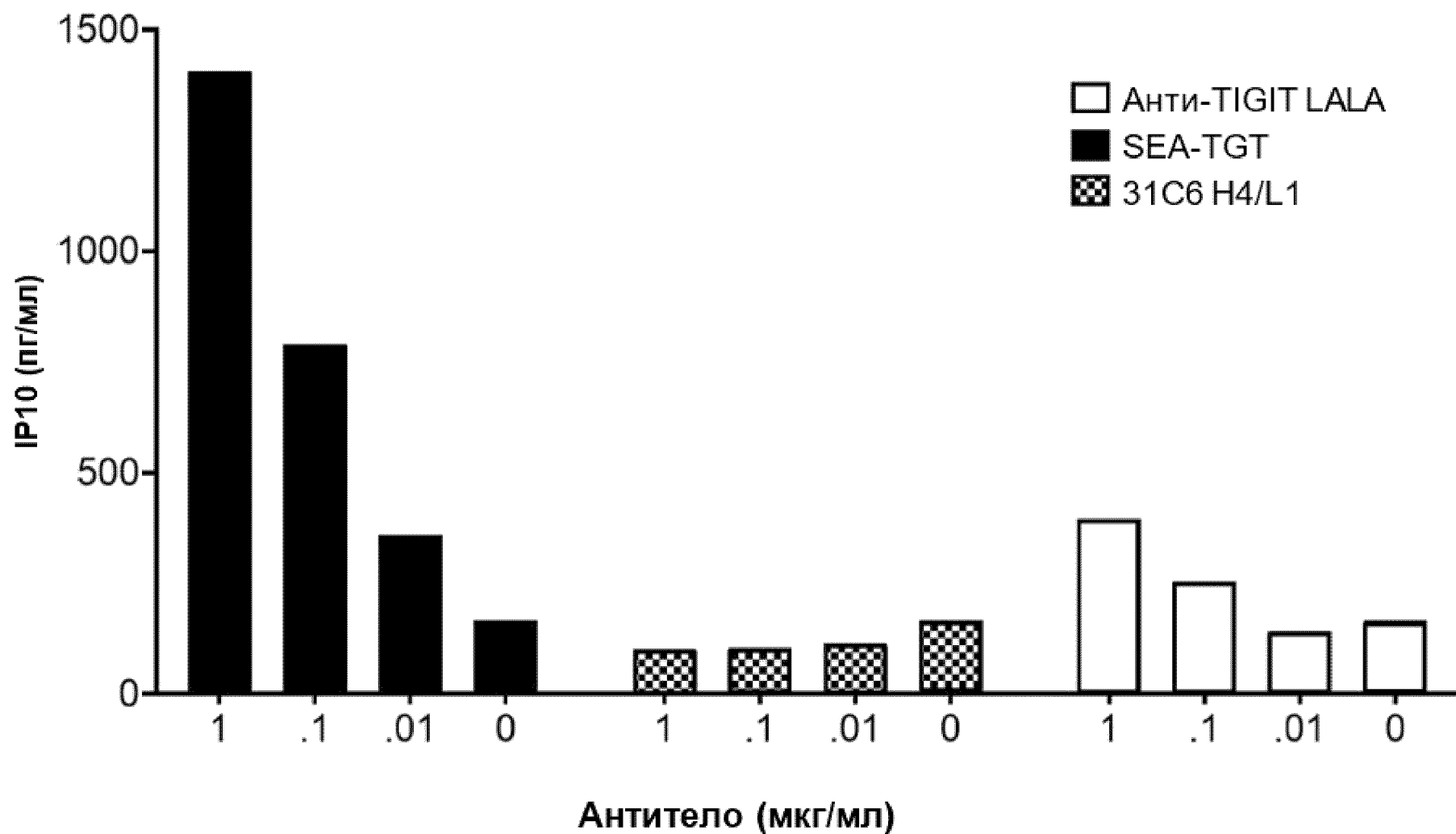
CXCL-10/IP10



Фиг. 16



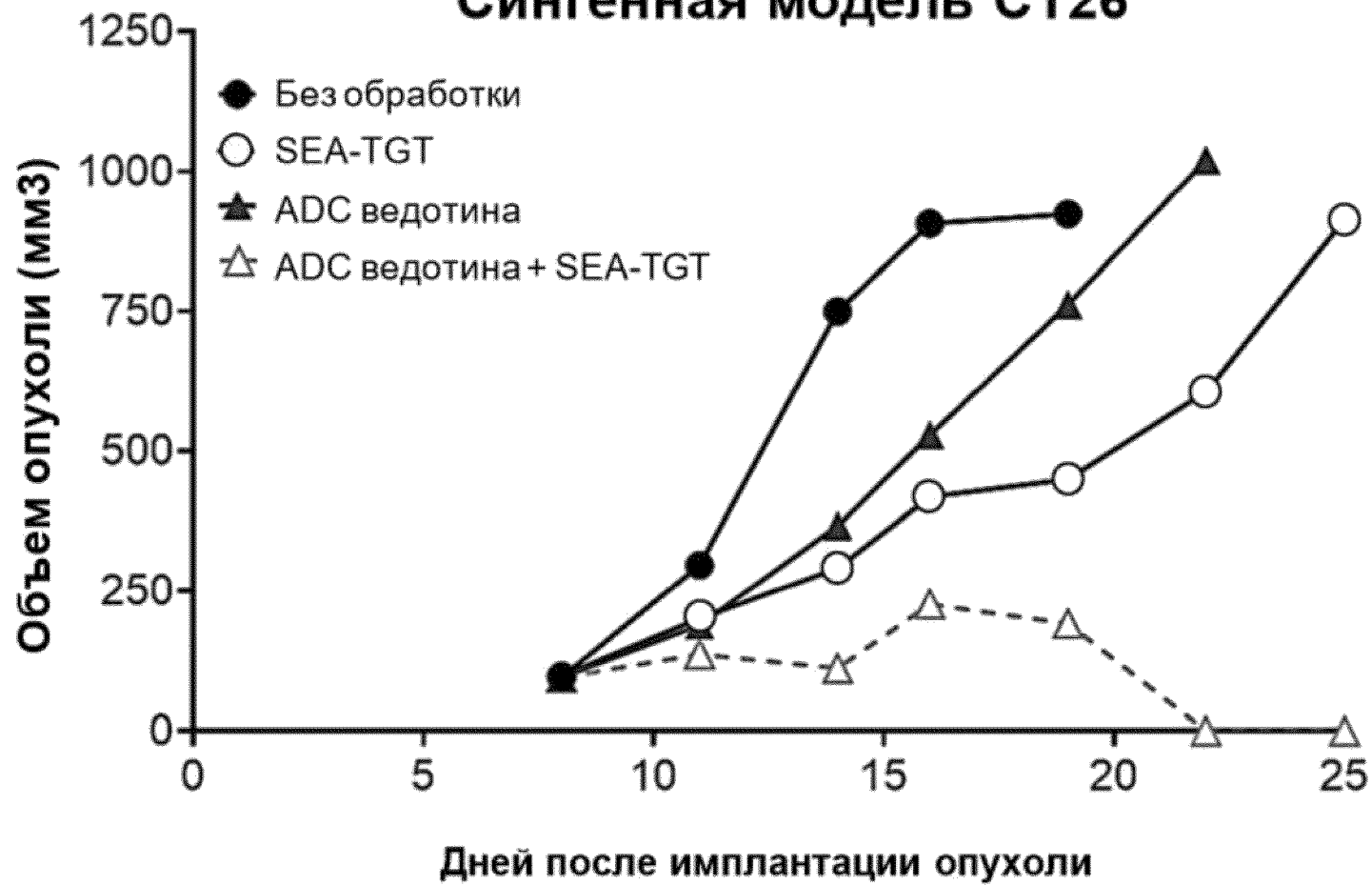
Фиг. 17



45/59

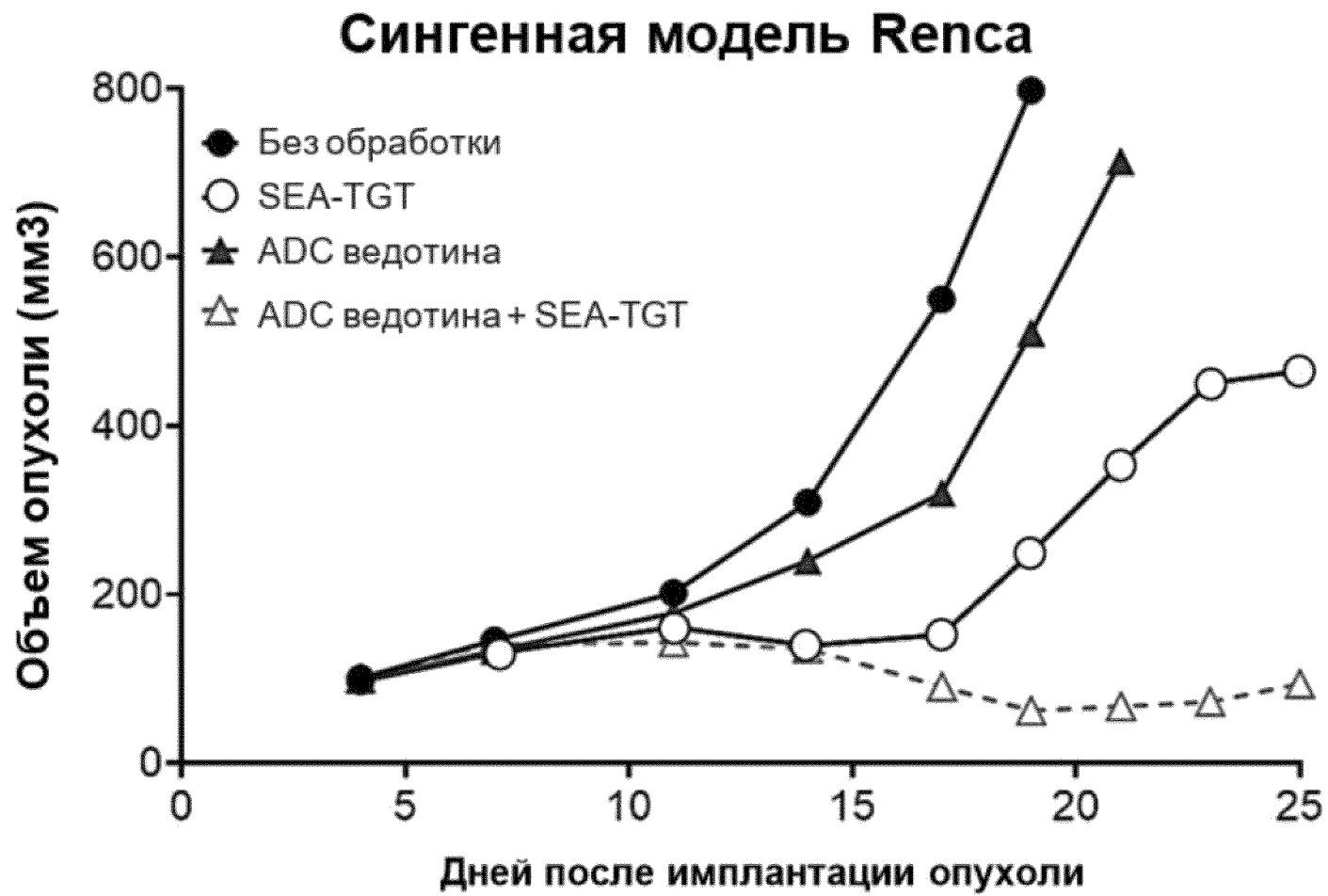
Фиг. 18А

Сингенная модель СТ26

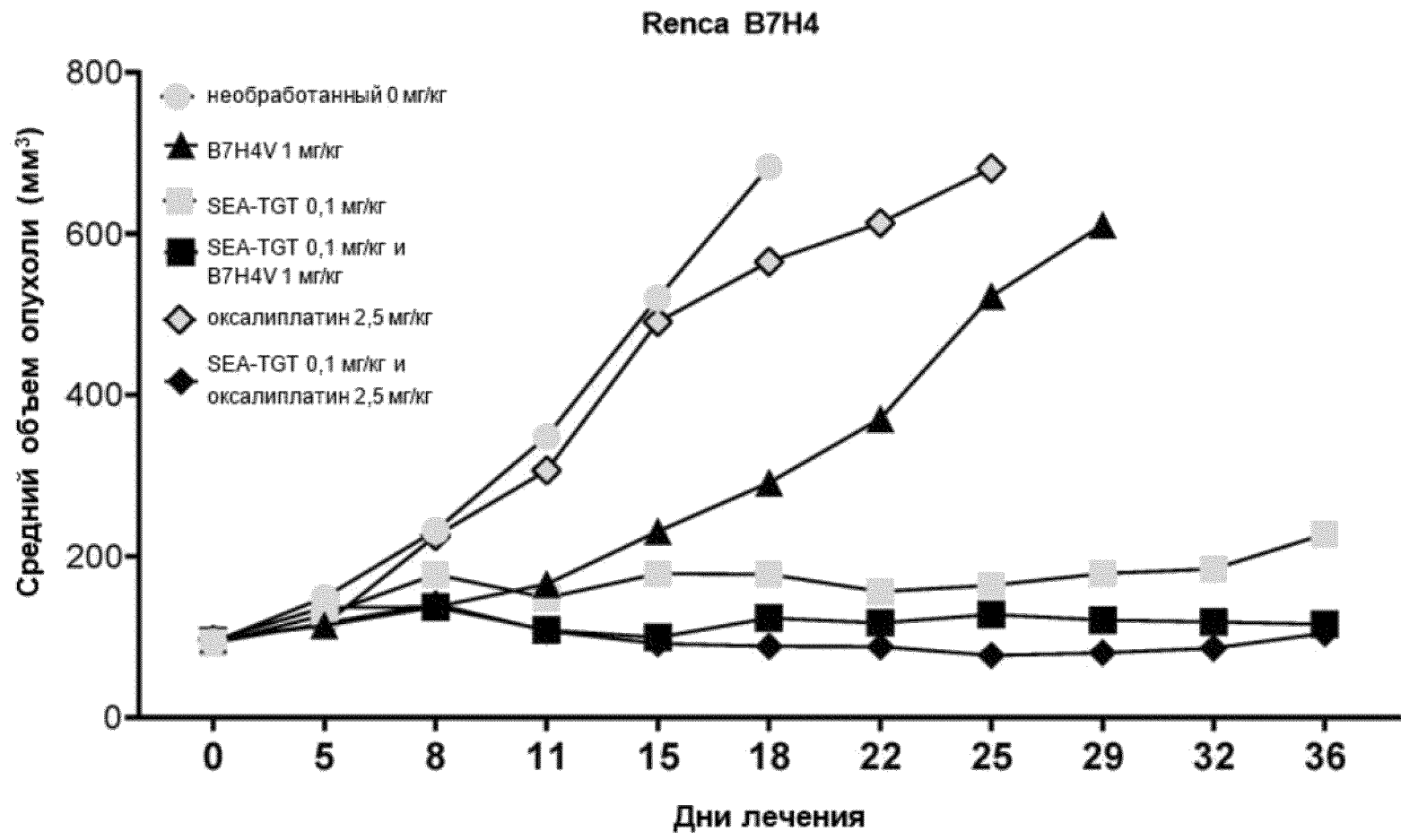


46/59

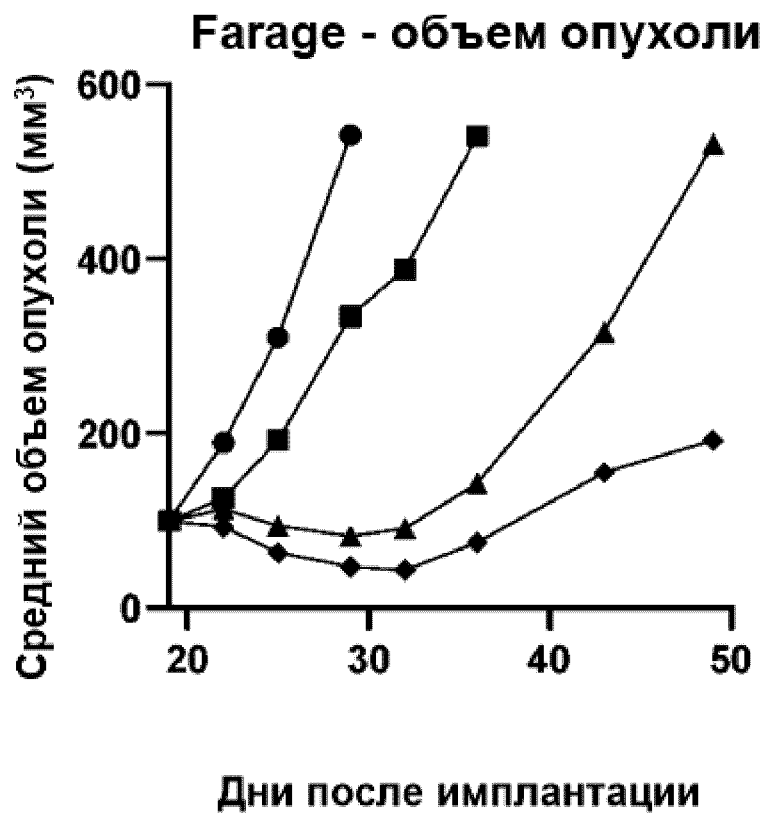
Фиг. 18В



Фиг. 18С

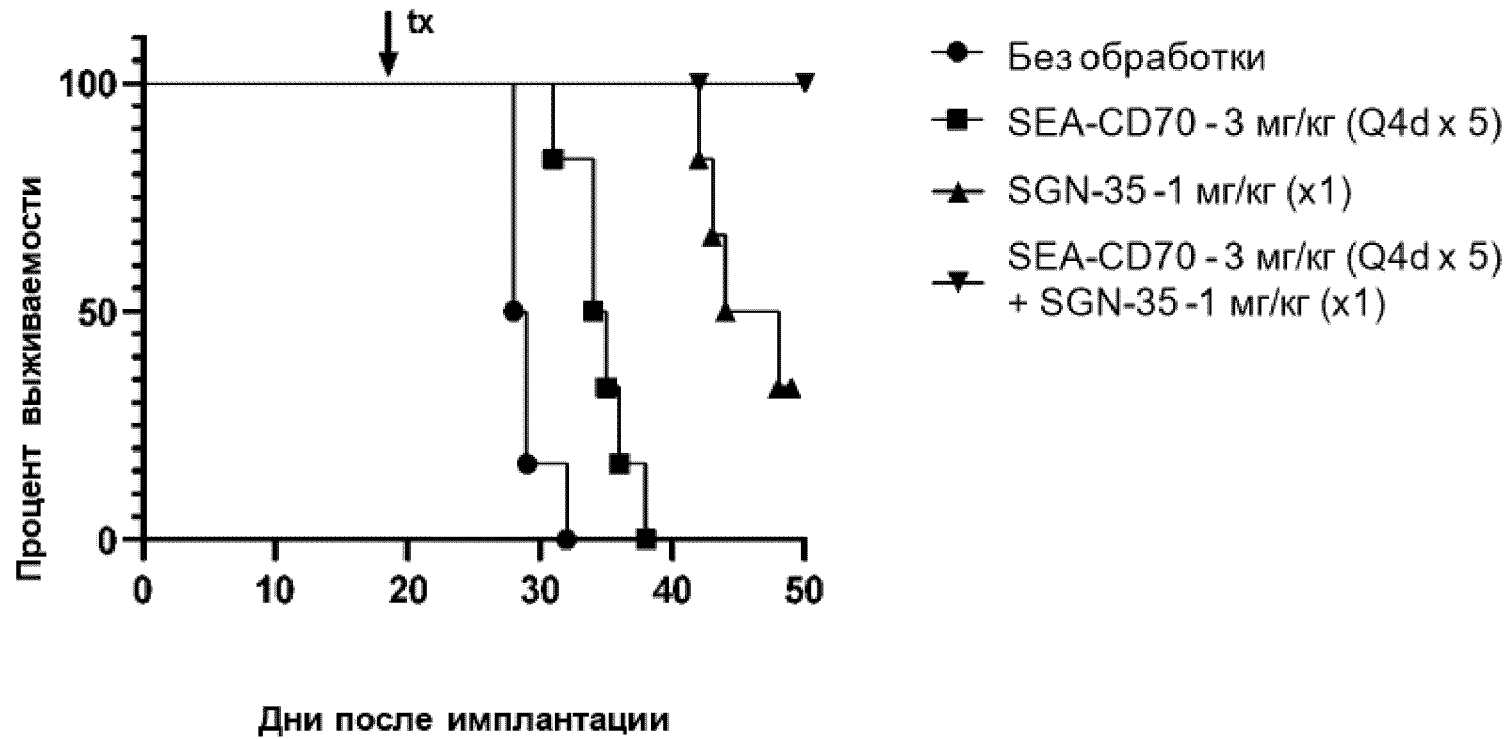


Фиг. 19

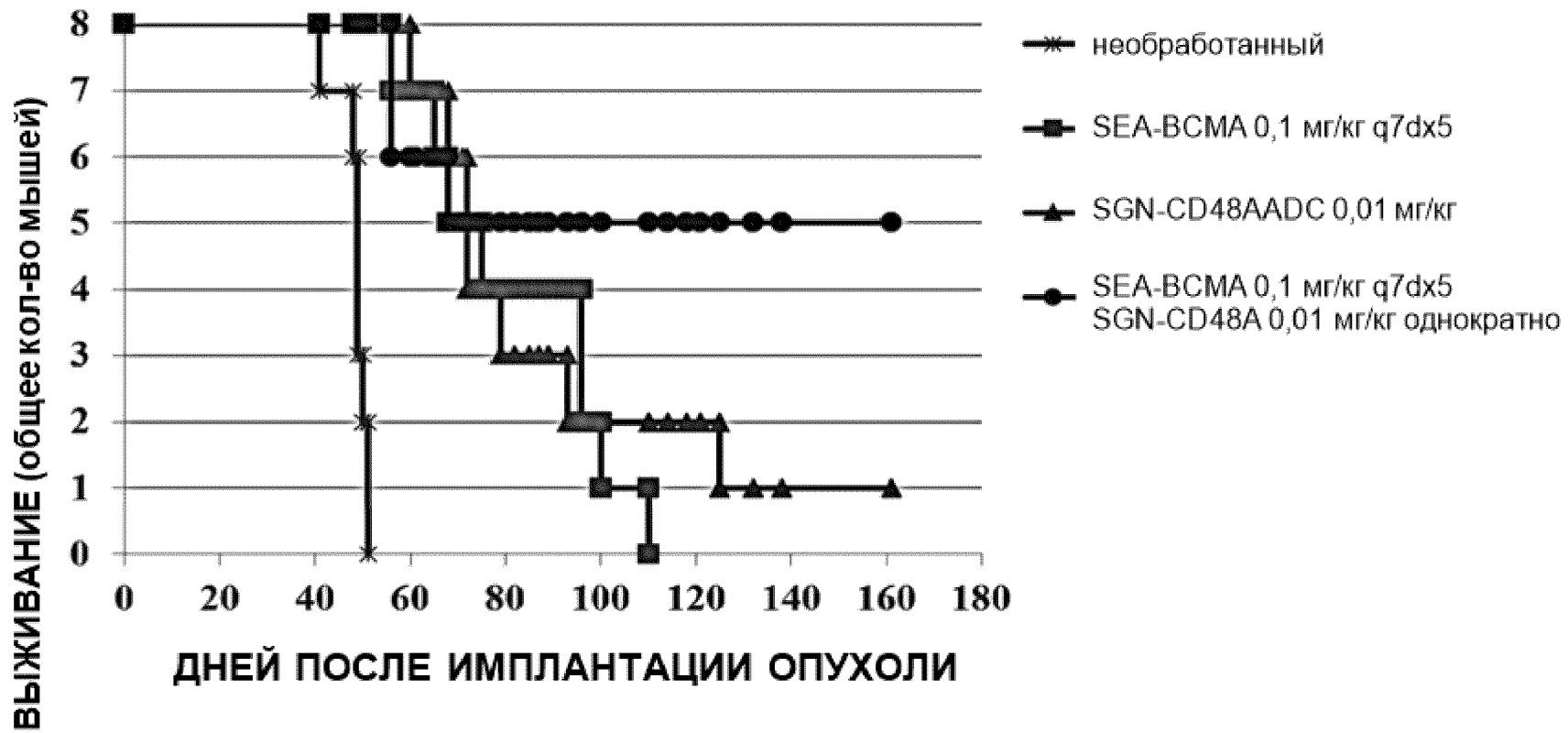


Фиг. 20А

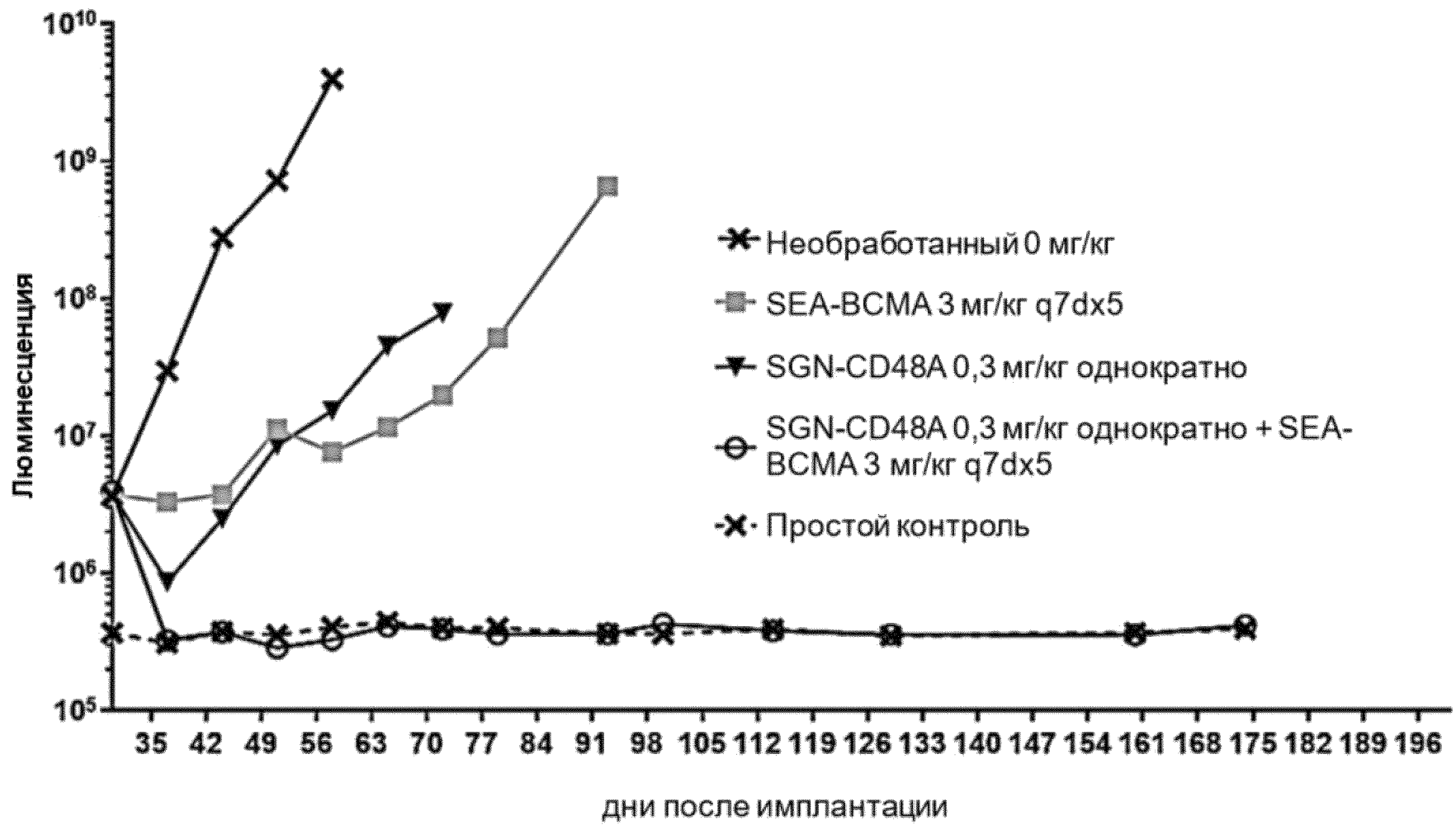
Farage - увеличение размера опухоли в 5 раз



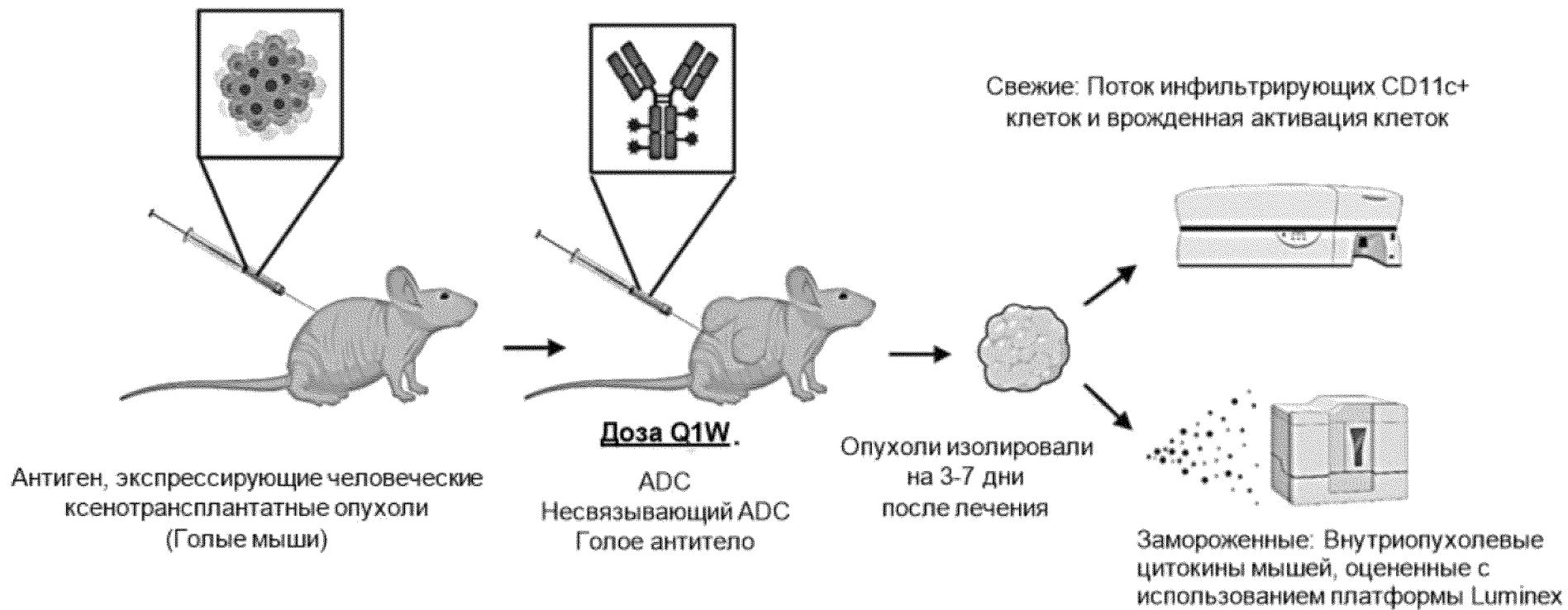
Фиг. 20В



Фиг. 21А

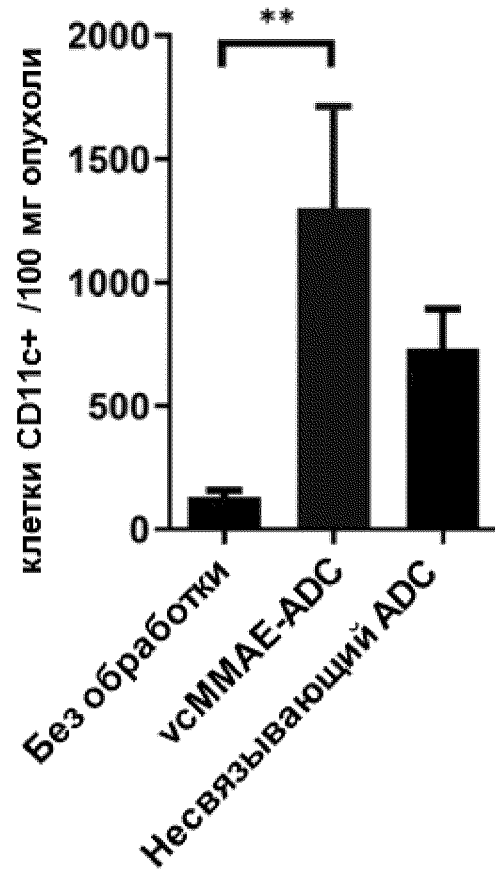


Фиг. 21В

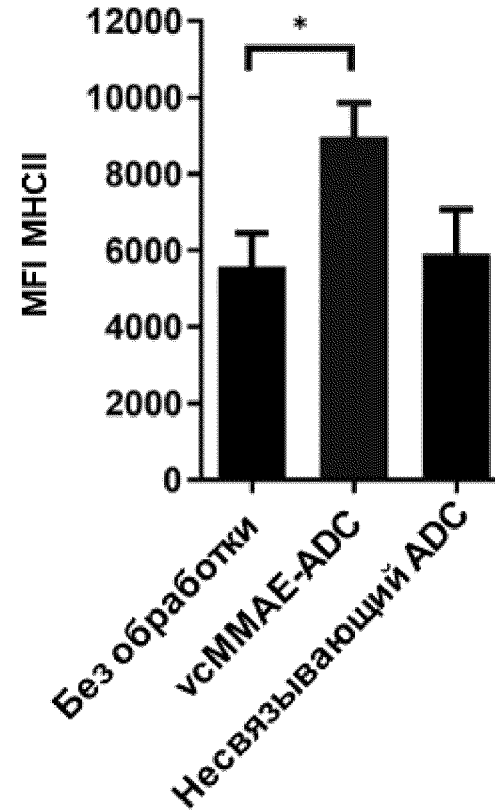


Фиг. 22А

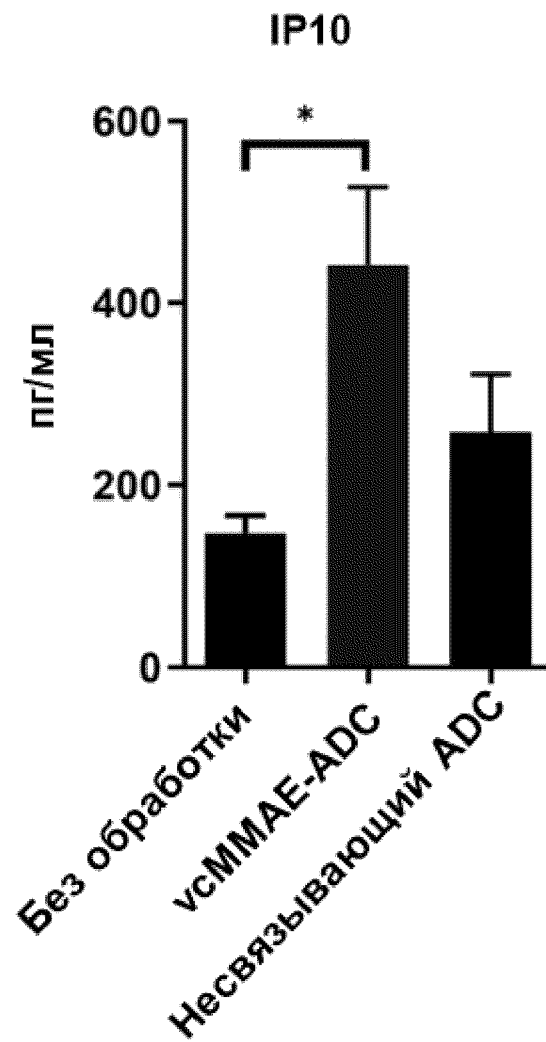
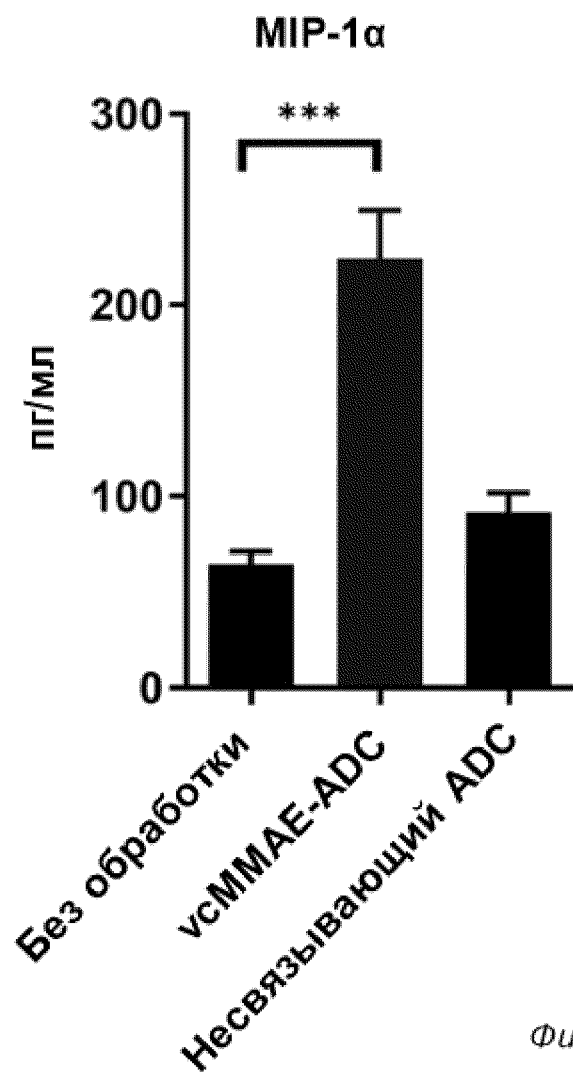
Инфильтрация дендритных клеток



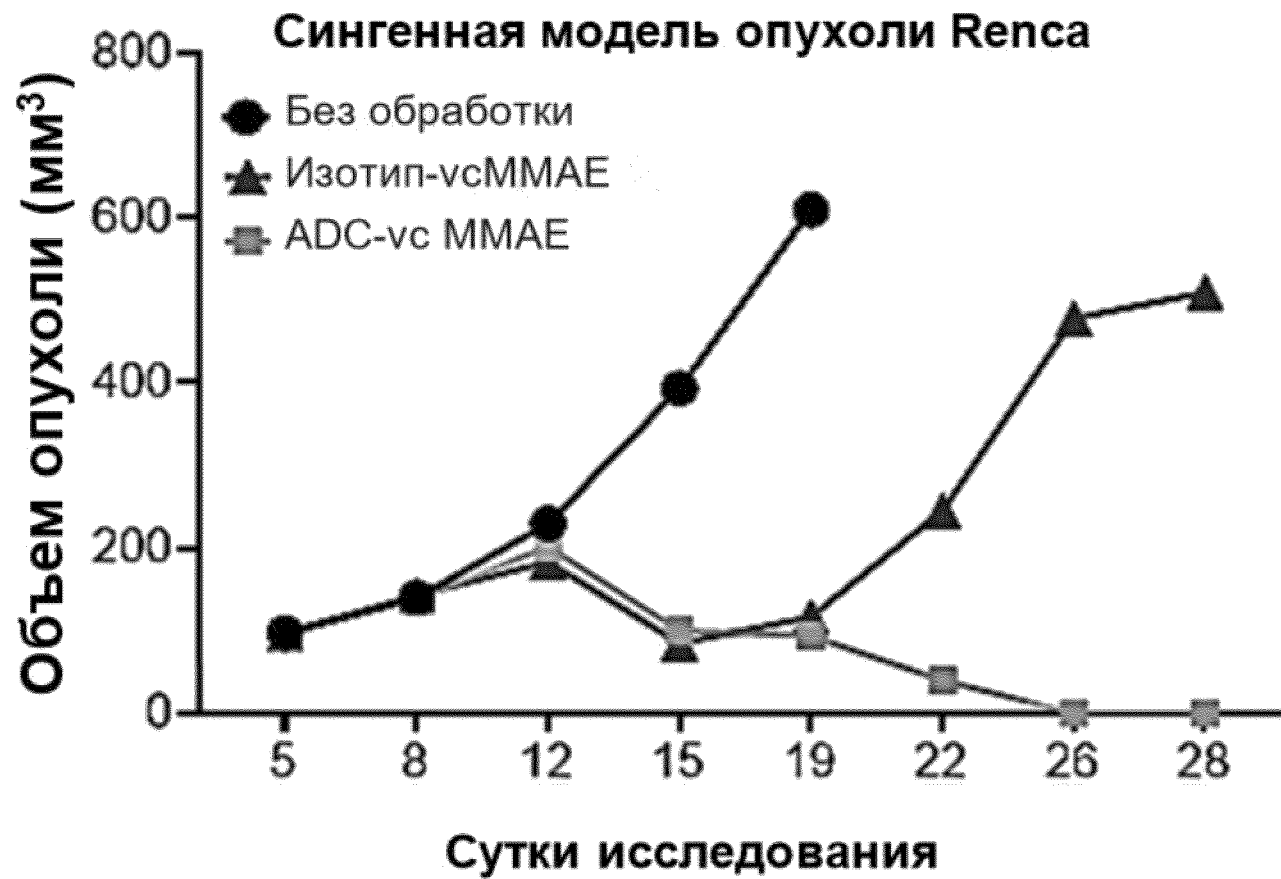
Дендритная клетка Антигенпрезентация



Фиг. 22В

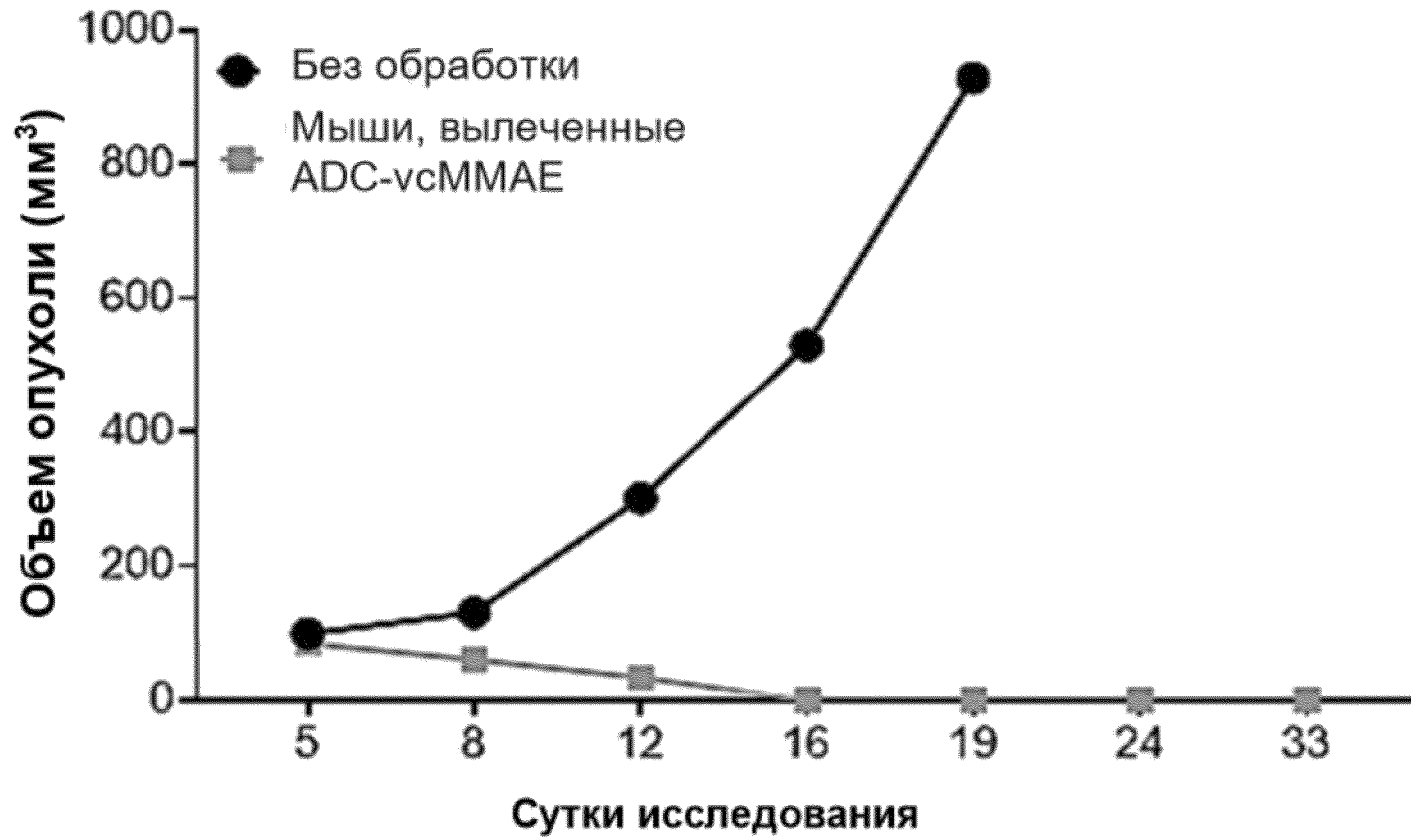


Фиг. 22С

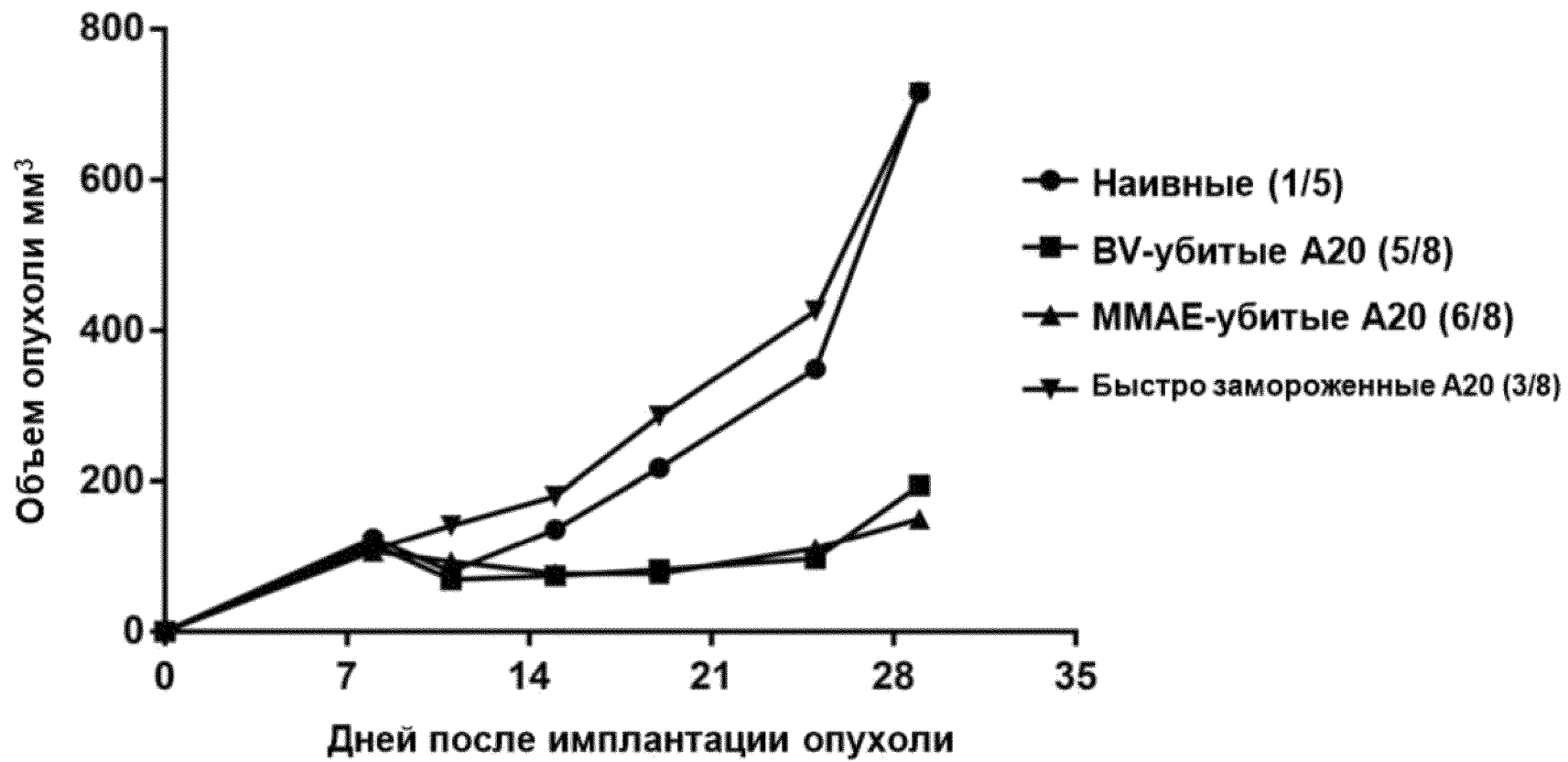


Фиг. 23А

Повторный вызов сингенной модели опухоли Ренса

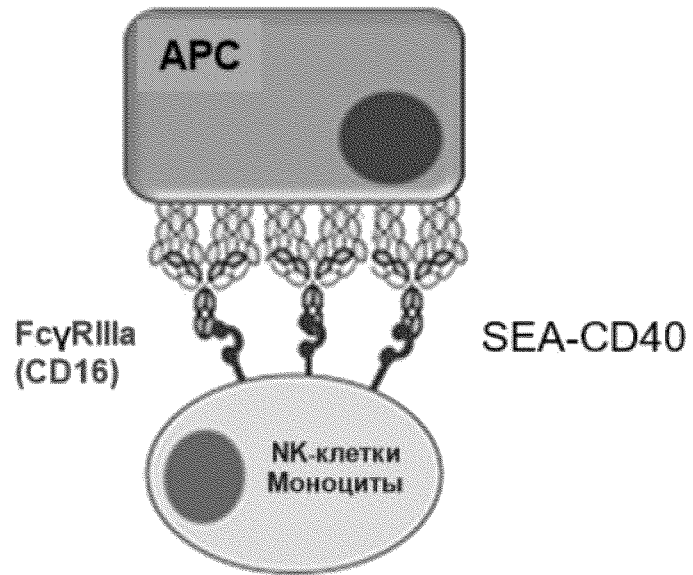


Фиг. 23В

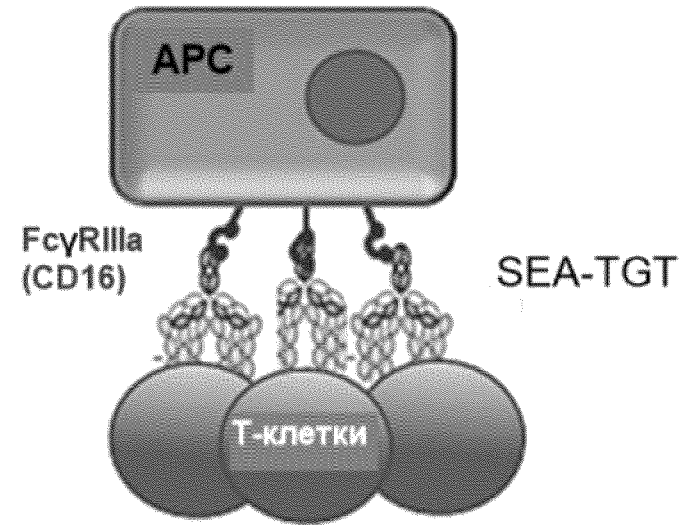


Фиг. 24

Кластеризация рецепторов и агонизм



Агонизм рецепторов/образование синапсов



Фиг. 25