

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390810 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.29

(22) Дата подачи заявки  
2021.09.10

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)  
A61K 31/00 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

---

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ В7-Н4

---

(31) 63/077,207

(32) 2020.09.11

(33) US

(86) PCT/EP2021/075005

(87) WO 2022/053650 2022.03.17

(71) Заявитель:  
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Киннир Криста Линн (US), Дэвис  
Гарет Чарльз, Риз Дэвид Гарет,  
Персиваль-Элвин Дженнифер Луиз,  
Эндрюс Джон Эдвард (GB), Чизбро  
Джон (US)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.  
(RU)

---

(57) Изобретение касается связывающих молекул (например, антител) для лечения рака и конъюгатов соответствующего антитела и лекарственного средства.

---

A1

202390810

202390810

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ В7-Н4  
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета в отношении предварительной заявки на патент США № 63/077207, поданной 11 сентября 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В  
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

**[0002]** В данный документ включен посредством ссылки во всей своей полноте машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, поданный одновременно с настоящей заявкой и определенный следующим образом: файл ASCII (текстовый) размером 50724 байта под названием "В7Н4-100-WO-РСТ.txt", созданный 8 сентября 2021 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

**[0003]** Настоящее изобретение касается связывающих молекул (например, антител) для лечения рака и конъюгатов соответствующего антитела и лекарственного средства.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0004]** Несмотря на годы изучения и разработки потенциальных противораковых лекарственных средств, рак остается одним из лидирующих заболеваний по всему миру, при этом у одного из трех индивидуумов развивается какая-либо форма рака в течение их жизни. Двумя из наиболее распространенных типов рака являются рак молочной железы и рак легкого.

**[0005]** Основными видами терапии рака остаются химиотерапия и лучевая терапия. Однако такие виды терапии ассоциированы с различными нежелательными побочными эффектами, от утомляемости до истощения и выпадения волос. Эти проблемы усугубляются тем, что курсы лечения с помощью применяемых средств химиотерапии часто являются очень длительными.

**[0006]** За последние пару десятилетий было разработано и представлено на рынке некоторое количество видов терапии рака на основе антител, что приводит к снижению потребности в жестких формах терапии (например, хирургии и химиотерапии) для некоторого количества типов рака. Хотя и доступность методики получения антител (например, моноклональных антитела) сильно улучшилась за этот период времени, существует относительно мало клинически доступных противораковых антител и еще меньше таких, которые можно применять для целенаправленного воздействия на широкий спектр типов рака. Кроме того, существует необходимость в повышении эффективности

терапевтических антител, которая в общем ограничивается целевым антигеном и последующими эффектами в отношении раковой клетки после связывания с антителом.

**[0007]** Настоящее изобретение позволяет решить одну или несколько из вышеупомянутых проблем.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0008]** Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что трансмембранный полипептид, B7-H4, на высоком уровне экспрессируется в нескольких типах клеток (например, рака молочной железы, легкого и поджелудочной железы), что согласуется с его ролью в качестве ракового антигена. Авторы настоящего изобретения успешно получили антитела, которые показывают высокий уровень связывания (например, лучшую степень связывания по сравнению с коммерчески доступными антителами) с клетками, экспрессирующими B7-H4, как *in vitro*, так и *in vivo*. Преимущественно, антитела могут целенаправленно взаимодействовать с несколькими разными типами клеток рака, экспрессирующими B7-H4, что иллюстрирует широкую применимость антител в качестве средств противораковой терапии.

**[0009]** Кроме того, антитела могут быть преимущественно связаны/конъюгированы с подходящими лекарственными средствами/цитотоксинами (например, для обеспечения получения конъюгатов антитела и лекарственного средства (ADC)), таким образом повышая эффективность антител в качестве средства терапии путем обеспечения целенаправленной доставки токсина к раковым клеткам.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

**[0010]** Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с B7-H4 (например, эпитопом B7-H4), при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;

- iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
- iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
- v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.

**[0011]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент соответствующим образом могут быть включены в фармацевтическую композицию, например в состав, подходящий для введения пациенту.

**[0012]** В другом аспекте предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
- iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
- iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ

ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или

- v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.

**[0013]** Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Такая композиция может быть стерильной и может содержать фармацевтически приемлемый носитель, такой как физиологический солевой раствор. Подходящие фармацевтические композиции могут содержать одно или несколько из буфера (например, ацетатного, фосфатного или цитратного буфера), поверхностно-активного вещества (например, полисорбата), стабилизатора (например, альбумина человека), консерванта (например, бензилового спирта) и стимулятора абсорбции для повышения биодоступности и/или других традиционных солюбилизирующих или диспергирующих средств.

**[0014]** Кроме того, было продемонстрировано, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению целенаправленно взаимодействуют с опухолями, положительными в отношении B7-H4, и подавляют их рост *in vivo*. Таким образом, настоящее изобретение охватывает определенные выше антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и определенную выше фармацевтическую композицию, предназначенные для применения в способе лечения рака. Предпочтительно указанный рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4.

**[0015]** В одном аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предназначенные для применения в лечении рака (например, где указанный рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4), при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID

- NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
  - iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
  - iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
  - v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.

**[0016]** Другими словами в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака (например, где указанный рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4), при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащих:

- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
- iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ

- ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
- iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
- v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.

**[0017]** Другими словами в другом аспекте настоящее изобретение охватывает применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака (например, где указанный рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4), при этом указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
- iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
- iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
- v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ

ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.

**[0018]** Далее будут изложены определенные определения и предпочтительные варианты осуществления. Следует понимать, что следующие определения и варианты осуществления могут относиться к любому аспекту, описанному в данном документе, например любому способу, композиции и/или композиции, предназначенной для применения в терапии, описанным в данном документе.

**[0019]** Термин "эпитоп" относится к области белка-мишени (например, полипептиду), способной связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению (например, быть связанным с его помощью).

**[0020]** В7-Н4 (также известный как содержащий V-образный домен ингибитор активации Т-клеток 1, кодируемый геном *VTCN1*) представляет собой трансмембранный полипептид из семейства В7 костимулирующих белков. Считается, что В7-Н4 экспрессируется на поверхности антигенпрезентирующих клеток для взаимодействий с лигандами иммунных клеток (например, Т-лимфоцитов, при этом CD28 представляет собой потенциальный лиганд). Без ограничения какой-либо теорией наблюдение авторов настоящего изобретения, что В7-Н4 на высоком уровне экспрессируется на клетках при различных типах рака, свидетельствует о том, что данная молекула представляет собой ассоциированный с опухолью антиген. Ввиду этого способность заявленного антитела целенаправленно взаимодействовать с экспрессирующими В7-Н4 клетками (и необязательно осуществлять доставку цитотоксина к ним) делает указанное антитело особенно подходящим для применения в терапии рака. Кроме того, экспрессия В7-Н4 не ограничивается конкретным типом рака, благодаря чему он представляет собой целевой антиген для лечения широкого спектра типов рака.

**[0021]** РНК, ДНК и аминокислотные последовательности В7-Н4 известны специалистам в данной области техники, и их можно найти во многих базах данных, например в базах данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и UniProt. Примерами таких последовательностей, которые находятся в UniProt, являются Q7Z7D3 (*VTCN1\_HUMAN*) для В7-Н4 человека и Q7TSP5 (*VTCN1\_MOUSE*) для В7-Н4 мыши. Нуклеотидная последовательность, кодирующая В7-Н4 человека, может представлять собой последовательность под SEQ ID NO: 53, более предпочтительно SEQ ID NO: 54. Полипептидная последовательность В7-Н4 человека предпочтительно представляет собой последовательность под SEQ ID NO: 55.

**[0022]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие

аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, в данном документе могут называться "ZY0EPQ-E02" или "EPQ-E02".

**[0023]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, в данном документе могут называться "ZY0EOB-F05" или "EOB-F05".

**[0024]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, в данном документе могут называться "ZY0EO5-E07" или "EO5-E07".

**[0025]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, в данном документе могут называться "ZY0EP0-C07" или "EP0-C07".

**[0026]** В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, могут называться "ZY0EQD-E02" или "EQD-E02".

**[0027]** Другими словами антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно могут содержать:

- HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или ее функциональный вариант;

- HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее функциональный вариант;
- HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или ее функциональный вариант;
- LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или ее функциональный вариант;
- LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11 или ее функциональный вариант; и
- LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант.

**[0028]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3 или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или ее функциональный вариант;
- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 или ее функциональный вариант; и
- vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или ее функциональный вариант.

**[0029]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или ее функциональный вариант;

- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или ее функциональный вариант; и
- vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или ее функциональный вариант.

**[0030]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20 или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21 или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 или ее функциональный вариант;
- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23 или ее функциональный вариант; и
- vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24 или ее функциональный вариант.

**[0031]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25 или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26 или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или ее функциональный вариант;
- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29 или ее функциональный вариант; и
- vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 или ее функциональный вариант.

**[0032]** Дополнительно или в качестве альтернативы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно описать с

помощью их вариабельной области тяжелой (VH) цепи и вариабельной области легкой (VL) цепи.

**[0033]** Подходящие последовательности вариабельной области тяжелой (VH) цепи (которую могут содержать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) изложены по отдельности ниже:

- последовательность под SEQ ID NO: 31 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 35 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 37 или ее функциональный вариант;
- последовательность под SEQ ID NO: 39 или ее функциональный вариант.

**[0034]** Особенно подходящие последовательности вариабельной области тяжелой (VH) цепи (которую могут содержать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) изложены по отдельности ниже:

- последовательность под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант.

**[0035]** Подходящие последовательности вариабельной области легкой (VL) цепи (которые могут содержать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) изложены по отдельности ниже:

- последовательность под SEQ ID NO: 32 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 36 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 38 или ее функциональный вариант.
- последовательность под SEQ ID NO: 40 или ее функциональный вариант.

**[0036]** Предпочтительная последовательность вариабельной области легкой (VL) цепи (которую может содержать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 (или ее функциональный вариант).

**[0037]** Например, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37 или 39 или их функциональным вариантом; и
- ii. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38 или 40 или их функциональным вариантом.

**[0038]** Например, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 43, 45, 46 или 47 или их функциональным вариантом; и
- ii. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38 или 40 или их функциональным вариантом.

**[0039]** Соответствующим образом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

- i. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант; и
- ii. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант.

**[0040]** Более соответствующим образом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

- i. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант; и
- ii. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант.

**[0041]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- переменную область тяжелой (VH) цепи и переменную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно или их функциональный вариант;
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 соответственно или их функциональный вариант;
- или
- VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно или их функциональный вариант.

**[0042]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: переменную область тяжелой (VH) цепи,

содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45, 33, 43, 46 или 47 (или их функциональный вариант); и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 (или ее функциональный вариант). Например, VH под SEQ ID NO: 33, 45, 46 и/ 47 может соответствовать "полученным путем обратной мутации к зародышевому типу" версиям VH под SEQ ID NO: 33 (например, все содержат одинаковые последовательности CDR, но с вариациями каркаса). Преимущественно каждый вариант сохраняет эквивалентные свойства связывания.

**[0043]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 31 или ее функциональный вариант; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 или ее функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, могут называться "ZY0EPD-E02" или "EPD-E02".

**[0044]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35 или ее функциональный вариант; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36 или ее функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, могут называться "ZY0EOB-F05" или "EOB-F05".

**[0045]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37 или ее функциональный вариант; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38 или ее функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, могут называться "ZY0EO5-E07" или "EO5-E07".

**[0046]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39 или ее функциональный вариант; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или ее функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

содержащие указанные последовательности, могут называться "ZY0EP0-C07" или "EP0-C07".

**[0047]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, могут называться "ZY0EQD-E02" или "EQD-E02".

**[0048]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант.

**[0049]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант.

**[0050]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант.

**[0051]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие указанные последовательности, могут называться "EQD-E02\_GL".

**[0052]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной

последовательностью под SEQ ID NO: 43. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

**[0053]** Дополнительно или в качестве альтернативы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно описать с помощью их тяжелой цепи и/или легкой цепи.

**[0054]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь (например, содержащую VL и константную область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 44. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь (например, содержащую VL и константную область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

**[0055]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 48. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48. Такая тяжелая цепь может называться "E02-GL-Maia-тяжелая цепь".

**[0056]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 49. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 49. Такая тяжелая цепь может называться "E02-GLY-Maia-тяжелая цепь".

**[0057]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 50. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50. Такая тяжелая цепь может называться "E02-GLQ-Maia-тяжелая цепь".

**[0058]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 51. В более предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51. Такая тяжелая цепь может называться "E02-GL-WT-тяжелая цепь".

**[0059]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 42. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

**[0060]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. Более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

**[0061]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь (например, содержащую VL и константную область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность

под SEQ ID NO: 44, и тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.

**[0062]** Авторы настоящего изобретения успешно продемонстрировали, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пунктам формулы настоящего изобретения могут целенаправленно взаимодействовать с более широким спектром экспрессирующих B7-H4 клеток по сравнению с существующими (коммерчески) доступными антителами, которые, как сообщается, целенаправленно взаимодействуют с B7-H4. Таким образом, авторы настоящего изобретения не только представили антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), характеризующееся аффинностью и специфичностью в отношении клинически важной мишени, но также продемонстрировали уникальное преимущество (например, неожиданный технический эффект), с ним ассоциированное.

**[0063]** Например, на фигуре 4 продемонстрировано, что иллюстративное антитело по пунктам формулы настоящего изобретения связывается с широким спектром типов раковых клеток с аффинностью, не достижимой с использованием следующих антител: IgG мыши к B7H4 человека от Biosciences 14-5949; B0000-35B, представляющего собой IgG мыши к B7H4 человека, от US biological; AF2514, представляющего собой IgG1 козы к B7H4 мыши, от R and D systems, и SAB2500141, представляющего собой IgG1 козы к B7H4, от Sigma.

**[0064]** Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, способны связываться с B7-H4 в качестве неотъемлемого компонента раковой клетки (например, B7-H4 в качестве неотъемлемого компонента клеточной мембраны раковой клетки).

**[0065]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут связываться с линией клеток OVCAR4 и/или линией клеток CHO (например, где может отсутствовать экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая B7-H4). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 (например, эпитопом B7-H4) линии клеток OVCAR4 и/или линии клеток CHO (например, где может отсутствовать экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая B7-H4). Соответствующим образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, могут связываться с линией клеток OVCAR4 и линией клеток CHO (например, где может отсутствовать экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая B7-H4).

**[0066]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с линией клеток OVCAR4 и/или линией клеток CHO (например,

где может отсутствовать экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая В7-Н4) с более высокой аффинностью по сравнению с одним или несколькими антителами, выбранными из 14-5949, представляющего собой IgG мыши к В7Н4 человека, от E Biosciences, B0000-35В, представляющего собой IgG мыши к В7Н4 человека, от US biological, AF2514, представляющего собой IgG1 козы к В7Н4 мыши, от R and D systems, SAB2500141, представляющего собой IgG1 козы к В7Н4, от Sigma, изотипа 1 CAT004 SP06-003, изотипа 2 нормального контроля IgG козы от R and D (AB-108C), MCA2632 от AdD serotec, 2516-1 от Epitomics, 145972-82 от eBiosciences, 145970-85 от eBioscience или их комбинации. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с линией клеток OVCAR4 и/или линией клеток CHO (например, где может отсутствовать экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая В7-Н4) с более высокой аффинностью по сравнению с одним или несколькими антителами, выбранными из 14-5949, представляющего собой IgG мыши к В7Н4 человека, от E Biosciences, B0000-35В, представляющего собой IgG мыши к В7Н4 человека от US biological, AF2514, представляющего собой IgG1 козы к В7Н4 мыши, от R and D systems и SAB2500141, представляющего собой IgG1 козы к В7Н4, от Sigma или их комбинации.

**[0067]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с линией клеток OVCAR4 с более высокой аффинностью по сравнению с 14-5949, представляющим собой IgG мыши к В7Н4 человека, от E Biosciences.

**[0068]** Ссылка на "14-5949, представляющий собой IgG мыши к В7Н4 человека, от E Biosciences" в данном документе может применяться взаимозаменяемо с термином "моноклональное антитело к В7-Н4 (Н74) от eBioscience". Указанное антитело доступно от ThermoFisher Scientific (№ по каталогу 14-5949-82).

**[0069]** В другом предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с линией клеток OVCAR4 с более высокой аффинностью по сравнению с B0000-35В, представляющим собой IgG мыши к В7Н4 человека, от US biological.

**[0070]** Указанная аффинность (например, аффинность связывания) может быть измерена любым подходящим способом измерения аффинности связывания, описанным в данном документе.

**[0071]** Линия клеток OVCAR4 представляет собой линию клеток карциномы яичника человека. Линию клеток OVCAR4 можно получить от Национального института рака с переносом линий клеток из Отделения депозитария опухолей для лечения и диагностики рака. Линия клеток яичника китайского хомячка (CHO) представляет собой

линию эпителиальных клеток, получаемую из яичника китайского хомячка, и ее получают для широкого использования.

**[0072]** Как описано выше, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержаться в фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т. п. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, раскрытых в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

**[0073]** В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержаться в одном или нескольких составах, выбранных из капсулы, таблетки, водной суспензии, раствора, назального аэрозоля или их комбинации.

**[0074]** В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит более чем один тип антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Например, фармацевтическая композиция может содержать два или больше, выбранных из антитела, антигенсвязывающего фрагмента, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированных с цитотоксином, или их комбинации.

**[0075]** Термин "фармацевтически эффективное количество" антитела или антигенсвязывающего фрагмента означает количество, достаточное для достижения эффективного связывания с мишенью и для достижения положительного эффекта, например облегчения симптомов заболевания или состояния или выявления вещества или клетки.

**[0076]** В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно стабилизирующее средство (например альбумин человека) и т. п.

**[0077]** Соответственно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с молекулой В7-Н4 с достаточной аффинностью, чтобы антитело являлось применимым в качестве терапевтического средства или диагностического реагента в отношении нацеливания на В7-Н4.

**[0078]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 (предпочтительно В7-Н4 человека) с константой

диссоциации (KD), составляющей  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 10$  пМ,  $\leq 1$  пМ или  $\leq 0,1$  пМ. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 (предпочтительно В7-Н4 человека) с KD, составляющей от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 40 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 30 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 20 нМ или от приблизительно 1,5 нМ до приблизительно 20 нМ.

**[0079]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 (предпочтительно В7-Н4 человека) с KD, составляющей от приблизительно 23 нМ до приблизительно 27 нМ. В более предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с В7-Н4 (предпочтительно В7-Н4 человека) с KD, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 1,5 нМ.

**[0080]** Измерения KD (аффинности связывания) можно проводить посредством любого подходящего анализа, известного из уровня техники. Подходящие анализы включают анализ аффинности, проводимый с помощью системы KinExA (например, KinExA 3100, KinExA 3200 или KinExA 4000) (Sapidyne Instruments, Айдахо) или системы ForteBio Octet.

**[0081]** В одном варианте осуществления степень связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению с неродственным, отличным от В7-Н4 белком составляет менее приблизительно 10%, 5%, 2% или 1% (предпочтительно менее приблизительно 10%) от связывания антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) с В7-Н4 (предпочтительно В7-Н4 человека). Указанное связывание может быть измерено, например, посредством радиоиммуноанализа (RIA), BIACORE® (с применением рекомбинантного В7-Н4 в качестве аналита и антитела в качестве лиганда или наоборот), KINEXA®, системы ForteBio Octet или других анализов связывания, известных из уровня техники.

**[0082]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с одной или несколькими молекулами, выбранными из молекулы В7-Н1 человека, молекулы В7-Н2 человека, молекулы В7-Н3 человека, молекулы ВTN1A1 человека, молекулы HHLA2 человека, молекулы ВTN3A2 человека или их комбинации. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с одной или несколькими молекулами, выбранными из молекулы В7-Н1 человека, молекулы В7-Н2 человека, молекулы В7-Н3 человека или их комбинации.

**[0083]** Термин "не связывается" означает что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, по сути не связываются с одной или несколькими из указанных молекул (например, молекулой В7-Н1 человека, молекулой В7-Н2 человека, молекулой В7-Н3 человека, молекулой ВТН1А1 человека, молекулой ННЛА2 человека, молекулой ВТН3А2 человека или их комбинацией). Термин "по сути не" при применении в контексте связывания в данном документе может означать, что менее 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% клеток, экспрессирующих одну или несколько из указанных молекул, в культуре клеток связываются антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (при контакте с ними). Соответственно, термин "по сути не" при применении в контексте связывания в данном документе может означать, что такие клетки не связываются.

**[0084]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с молекулой В7-Н1 человека, молекулой В7-Н2 человека, молекулой В7-Н3 человека, молекулой ВТН1А1 человека, молекулой ННЛА2 человека или молекулой ВТН3А2 человека. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с молекулой В7-Н1 человека, молекулой В7-Н2 человека или молекулой В7-Н3 человека.

**[0085]** В одном варианте осуществления полипептид В7-Н4 содержится в пределах полипептидной последовательности В7-Н4 или ее фрагмента.

**[0086]** "Полипептид В7-Н4" может содержать полноразмерную полипептидную последовательность В7-Н4 (например, под SEQ ID NO.: 55) или может содержать фрагмент В7-Н4 любой длины от полноразмерной полипептидной последовательности В7-Н4 (например, содержащий полипептидную последовательность с 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85% или 95% от полноразмерной полипептидной последовательности В7-Н4), которая содержит эпитоп, который может связываться (например, быть связанным) антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению. Полипептид В7-Н4 может содержать последовательность, характеризующуюся 75%, 80%, 85%, 90% или 90% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO.: 55. Предпочтительно полипептид В7-Н4 содержит последовательность под SEQ ID NO.: 55.

**[0087]** Антитело или антигенсвязывающий фрагмент характеризуются высокой аффинностью в отношении В7-Н4 как *in vitro*, так и *in vivo* и, таким образом, могут успешно применяться в способах выявления эпитопа В7-Н4 и ассоциированных способах диагностики.

**[0088]** Термин "лечить" относится к терапевтическим мерам, с помощью которых обеспечивают излечение, замедляют течение, облегчают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, которые уже имеют нарушение. В одном варианте осуществления субъект успешно "проходит лечение" заболевания или нарушения (предпочтительно рака) в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, если у пациента наблюдается, например, полное, частичное или временное облегчение или устранение симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением (предпочтительно раком).

**[0089]** В одном варианте осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением может применяться для предупреждения начала развития рака, предусматривающего раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4. Термин "предупредить" относится к профилактическим или предупредительным мерам, с помощью которых осуществляют предупреждение и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в предупреждении включают тех, которые предрасположены к наличию данного нарушения или восприимчивы к нему. В одном варианте осуществления успешно осуществляется предупреждение заболевания или нарушения (предпочтительно рака) в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, если у пациента, например, временно или постоянно обнаруживается меньшее количество или меньшая степень тяжести симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, или более позднее начало проявления симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, по сравнению с пациентом, не подвергавшимся воздействию способов по настоящему изобретению.

**[0090]** Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения субъекта-млекопитающего. В одном варианте осуществления "субъект" представляет собой человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных, используемых в спорте животных и зоопарковых животных, например, людей, отличных от человека приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот и т. д. В одном варианте осуществления субъектом является яванский макак (*Macaca fascicularis*). В предпочтительном варианте осуществления субъектом является человек. В способах по настоящему изобретению у субъекта ранее может быть не диагностировано наличие рака. В качестве альтернативы, у субъекта ранее может быть диагностировано наличие рака. Субъект также может быть субъектом, у которого проявляются факторы риска развития заболевания, или субъектом, у которого не проявляются симптомы рака. Субъект также

может быть субъектом, который страдает раком или характеризуется риском его развития. Таким образом, в одном варианте осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением может применяться для подтверждения наличия рака у субъекта. Например, у субъекта ранее мог быть диагностирован рак с помощью альтернативных способов. В одном варианте осуществления субъекту ранее вводили средство противораковой терапии.

**[0091]** В одном варианте осуществления способы лечения по настоящему изобретению предусматривают одну или несколько стадий введения, выбранных из перорального, внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного, ректального или вагинального, ингаляционного, местного или их комбинации. В предпочтительном варианте осуществления введение является внутривенным или внутриартериальным (например, путем инъекции или с применением капельницы) или представляет собой их комбинацию.

**[0092]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляются непосредственно в место расположения вредной клеточной популяции (например, тем самым повышая контактное влияние терапевтического средства на пораженную заболеванием ткань). В одном варианте осуществления введение осуществляется непосредственно в дыхательные пути, например, путем ингаляции или интраназального введения.

**[0093]** В предпочтительном варианте осуществления рак, на который ссылаются в данном документе, представляет собой рак, характеризующийся экспрессией (предпочтительно сверхэкспрессией) молекулы B7-H4. Другими словами, рак, на который ссылаются в данном документе, может предусматривать раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4. Указанная раковая клетка может содержаться в опухоли.

**[0094]** В одном варианте осуществления рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточной и аденокарциномы), рака поджелудочной железы и рака желудка.

**[0095]** В одном варианте осуществления рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из колоректального рака, HNSCC, рака предстательной железы, рака легкого (например, NSCLC или SCLC), рака молочной железы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желудка, холангиокарциномы, меланомы, рака эндометрия, гематологического рака (AML, MM, DLBCL) и видов рака, содержащих CSC.

**[0096]** В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы или их комбинацию. Например, рак может представлять

собой рак легкого. Рак может представлять собой рак молочной железы. Рак может представлять собой рак яичника.

**[0097]** В одном варианте осуществления рак представляет собой один или несколько видов рака молочной железы, выбранных из положительного по гормональным рецепторам (HR+) рака молочной железы, положительного по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (HER2+) рака молочной железы, трижды отрицательного рака молочной железы (TNBC). Субъект может удовлетворять требования для лечения герцептином. Субъект мог получать лечение герцептином.

**[0098]** В одном варианте осуществления рак представляет собой один или несколько из немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), предпочтительно выбран из плоскоклеточной NSCLC, аденокарциномы NSCLC или их комбинации.

**[0099]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также находят применение при выявлении раковой клетки, например, в качестве части диагностического способа.

**[0100]** В дополнительном аспекте предусмотрен способ выявления присутствия или отсутствия полипептида В7-Н4 (например, эпитопа полипептида В7-Н4) в образце, включающий:

- a. приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или фармацевтической композицией, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с обеспечением получения комплекса антитело-антиген, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
  - i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
  - ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
  - iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14,

- SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
- iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
- v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант;
- b. выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса антитело-антиген; и
- c. при этом присутствие комплекса антитело-антиген подтверждает присутствие полипептида В7-Н4 (например, эпитопа полипептида В7-Н4); или
- d. при этом отсутствие комплекса антитело-антиген подтверждает отсутствие полипептида В7-Н4 (например, эпитопа полипептида В7-Н4).

**[0101]** В связанном аспекте предусмотрен способ выявления присутствия или отсутствия раковой клетки, экспрессирующей полипептид В7-Н4 (например, эпитоп полипептида В7-Н4), в образце, включающий:

- a. приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или фармацевтической композицией, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с обеспечением получения комплекса антитело-антиген; где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;

- iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
  - iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
  - v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант;
- b. выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса антитело-антиген; и
  - c. при этом присутствие комплекса антитело-антиген подтверждает присутствие полипептида В7-Н4 (например, эпитопа полипептида В7-Н4); или
  - d. при этом отсутствие комплекса антитело-антиген подтверждает отсутствие полипептида В7-Н4 (например, эпитопа полипептида В7-Н4).

**[0102]** Настоящее изобретение охватывает соответствующее применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению для выявления полипептида В7-Н4 (например, эпитопа полипептида В7-Н4).

**[0103]** В одном варианте осуществления присутствие комплекса антитело-антиген является признаком присутствия раковой клетки, а отсутствие комплекса антитело-антиген является признаком отсутствия раковой клетки. Например, способ может предусматривать подтверждение присутствия рака, если комплекс антитело-антиген выявлен, или отсутствие подтверждения присутствия рака, если комплекс антитело-антиген не выявлен.

**[0104]** В предпочтительном варианте осуществления раковая клетка представляет собой раковую клетку, экспрессирующую полипептид В7-Н4 (например, эпитоп полипептида В7-Н4).

**[0105]** Таким образом, настоящее изобретение охватывает соответствующее применение стадий способа, описанных в данном документе, в способах диагностики рака у субъекта, предпочтительно где указанный рак предусматривает раковую клетку, экспрессирующую В7-Н4.

[0106] В одном варианте осуществления способ выявления или способ диагностики может включать измерение уровня экспрессии В7-Н4 на клетке (или ткани), получаемой от субъекта, и сравнение измеренного уровня экспрессии со стандартной экспрессией В7-Н4 в контрольной клетке (или ткани), где повышение уровня экспрессии по сравнению с контролем является признаком наличия рака. Предпочтительно указанный контрольный образец содержит отличную от раковых (например, нормальную) клетку.

[0107] "Комплекс антитело-антиген" означает комплекс (например, макромолекулярный комплекс), содержащий антиген В7-Н4, который связался с антителом. Термин "комплекс антитело-антиген" может применяться синонимически с терминами "комплекс связанный В7-Н4-антитело" и "антитело, связанное с В7-Н4".

[0108] Комплекс антитело-антиген может быть выявлен любыми способами, известными специалисту в данной области техники. В одном варианте осуществления антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) мечено выявляемой меткой. Указанная метка может представлять собой эпифлуоресцентную метку. В предпочтительном варианте осуществления антитело мечено с помощью 800CW.

[0109] В одном варианте осуществления комплекс антитело-антиген выявляют посредством вторичного (например, выявляемого) антитела, которое связывает антитело и/или комплекс антитело-антиген.

[0110] Соответственно, указанное вторичное антитело содержит средство выявления, такое как идентификационная метка/метка, для способствования выявлению. Указанные средства выявления предпочтительно конъюгированы с вторичным антителом. Примеры подходящих меток включают выявляемые метки, такие как радиоактивные метки или флуоресцентные или красящие молекулы, ферментативные маркеры или хромогенные маркеры – например красители, которые обеспечивают видимое изменение цвета при связывании выявляемого антитела с антигеном. В качестве примера метка может представлять собой флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), R-фикоэритрин, Alexa 532, CY3 или дигоксигенин. Метка может представлять собой репортерную молекулу, которая выявляется непосредственно, как, например, путем выявления ее флуоресцентного сигнала или путем проявления метки на фотографической или рентгеновской пленке. В качестве альтернативы метка не выявляется непосредственно, но может быть выявлена, например, в двухфазной системе. Примером непрямого обнаружения метки является связывание антитела с меткой.

[0111] В предпочтительном варианте осуществления указанное вторичное антитело содержит флуоресцентную идентификационную метку, и комплекс антитело-антиген выявляется по флуоресценции, испускаемой от комплекса антитело-антиген-вторичное

антитело. "Комплекс антитело-антиген-вторичное антитело" означает комплекс, содержащий антиген (например, B7-H4), который связался с антителом, где указанный комплекс дополнительно связался вторичным антителом, которое связывает указанное антитело и/или комплекс антитело-антиген.

**[0112]** Соответственно, комплекс антитело-антиген выявляется, когда сигнал (предпочтительно, флуоресценция), испускаемый от выявляемой метки, является большим, чем сигнал, выявляемый в контроле, не содержащем антитело (например, без антитела, которое связывает B7-H4). Указанный контроль в качестве альтернативы может содержать B7-H4, но образец не применяется в отношении указанного контроля.

**[0113]** Соответственно, "образец" представляет собой образец, полученный от субъекта (например, биоптат), из линии клеток, культуры ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих B7-H4. В предпочтительном варианте осуществления образец представляет собой биоптат, полученный от субъекта. Указанный биоптат может быть отобран из опухоли или места, для которого существует риск развития опухоли.

**[0114]** В предпочтительном варианте осуществления образец представляет собой выделенный образец, получаемый (например, полученный) от субъекта.

**[0115]** В предпочтительном варианте осуществления полипептид B7-H4 (например, эпитоп полипептида B7-H4) является составным компонентом раковой клетки, более предпочтительно составным компонентом клеточной мембраны раковой клетки.

**[0116]** Настоящее изобретение охватывает антитела (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), определенные в данном документе, содержащие перечисленные последовательности CDR или последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи (эталонные антитела), а также их функциональные варианты. Функциональный вариант связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена, что и эталонное антитело. Функциональные варианты могут характеризоваться иной аффинностью в отношении антигена-мишени по сравнению с эталонным антителом, но предпочтительной является по сути та же аффинность.

**[0117]** Термин "эталонное антитело", в случае сравнения, применяют для удобной ссылки на антитело или его антиген по настоящему изобретению. Таким образом, термин "эталонное антитело" относится к антителу или соответствующему антигену по настоящему изобретению. Например, эталонное антитело может означать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,

LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно. Более конкретно эталонное антитело может означать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34. Предпочтительно эталонное антитело может означать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

**[0118]** В одном варианте осуществления функциональные варианты эталонного антитела демонстрируют изменение последовательности в одной или нескольких CDR по сравнению с соответствующими эталонными последовательностями CDR. Таким образом, функциональный вариант антитела может предусматривать функциональный вариант CDR. Если термин "функциональный вариант" используется в контексте последовательности CDR, то это означает, что данная CDR характеризуется не более чем 2, предпочтительно не более чем 1 аминокислотным различием по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR и в сочетании с оставшимися 5 CDR (или их вариантами) обеспечивает возможность связывания вариантного антитела с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена, что и эталонное антитело. Функциональный вариант может называться "вариантным антителом".

**[0119]** В одном варианте осуществления вариантное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит:

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

при этом вариантное антитело связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

**[0120]** Предпочтительно вариантное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит:

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR;

при этом вариантное антитело связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

**[0121]** Например, вариант антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать:

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 7;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 8; и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 9;

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 10;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 11;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 2 аминокислотных различий по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 12;

при этом вариантное антитело связывается с полипептидом B7-H4 (например, эпитопом полипептида B7-H4) и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

**[0122]** Например, вариант антитела или антигенсвязывающего фрагмента может (предпочтительно) содержать:

CDR1 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 7;

CDR2 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 8; и

CDR3 тяжелой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 9;

CDR1 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 10;

CDR2 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 11;

CDR3 легкой цепи, характеризующуюся наличием не более чем 1 аминокислотного различия по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 12;

при этом вариантное антитело связывается с полипептидом B7-H4 (например, эпитопом полипептида B7-H4) и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

**[0123]** Вышеизложенное может быть применено аналогично к вариантам других антител, описанных в данном документе, где аминокислотные различия определены относительно их последовательностей CDR, и где вариантное антитело связывается с тем же антигеном-мишенью, что и указанные антитела, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена.

**[0124]** В одном варианте осуществления вариантное антитело может характеризоваться наличием в общей сложности не более чем 5, 4 или 3 аминокислотных различий в его CDR по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 (предпочтительно не более 1) аминокислотных различий на CDR. Предпочтительно, вариантное антитело характеризуется наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в его CDR по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 аминокислотных различий на CDR. Более предпочтительно, вариантное антитело характеризуется наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в его CDR по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 1 аминокислотного различия на CDR.

**[0125]** Аминокислотное различие может представлять собой аминокислотную замену, вставку или делецию. В одном варианте осуществления аминокислотное различие представляет собой консервативную аминокислотную замену, описанную в данном документе.

**[0126]** В одном варианте осуществления вариантное антитело содержит те же каркасные последовательности, что и иллюстративные антитела, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления вариантное антитело может содержать каркасную область, характеризующуюся наличием не более чем 2, предпочтительно не более чем 1 аминокислотного различия (по сравнению с соответствующей эталонной каркасной последовательностью). Таким образом, каждая каркасная область может характеризоваться наличием не более чем 2, предпочтительно не более чем 1 аминокислотного различия (по сравнению с соответствующей эталонной каркасной последовательностью).

**[0127]** В одном варианте осуществления вариантное антитело может характеризоваться наличием в общей сложности не более чем 5, 4 или 3 аминокислотных различий в его каркасных областях по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 (предпочтительно не более 1) аминокислотных различий на каркасную область. Предпочтительно, вариантное антитело характеризуется наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в его каркасных областях по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 2 аминокислотных различий на каркасную область. Более предпочтительно, вариантное антитело характеризуется наличием в общей сложности не более чем 2 (более предпочтительно не более чем 1) аминокислотных различий в его каркасных областях по сравнению с соответствующим эталонным антителом при условии, что имеется не более 1 аминокислотного различия на каркасную область.

**[0128]** Таким образом, вариантное антитело может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, описанные в данном документе, где

тяжелая цепь характеризуется наличием не более чем 14 аминокислотных различий (не более чем 2 аминокислотных различий в каждой CDR и не более чем 2 аминокислотных различий в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью тяжелой цепи в данном документе, и

легкая цепь характеризуется наличием не более чем 14 аминокислотных различий (не более чем 2 аминокислотных различий в каждой CDR и не более чем 2 аминокислотных различий в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью легкой цепи в данном документе;

при этом вариантное антитело связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело.

**[0129]** Указанные варианты тяжелых или легких цепей могут называться "функциональными эквивалентами" эталонных тяжелых или легких цепей.

**[0130]** В одном варианте осуществления вариантное антитело может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, описанные в данном документе, где

тяжелая цепь характеризуется наличием не более чем 7 аминокислотных различий (не более чем 1 аминокислотного различия в каждой CDR и не более чем 1 аминокислотного различия в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью тяжелой цепи в данном документе, и

легкая цепь характеризуется наличием не более чем 7 аминокислотных различий (не более чем 1 аминокислотного различия в каждой CDR и не более чем 1 аминокислотного различия в каждой каркасной области) по сравнению с последовательностью легкой цепи в данном документе;

при этом вариантное антитело связывается с тем же антигеном-мишенью, что и эталонное антитело, и предпочтительно проявляет такую же перекрестную реактивность в отношении антигена (или ее отсутствие), что и эталонное антитело. Конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC)

**[0131]** Преимущественно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать гетерологичное средство. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связаны с гетерологичным средством. В предпочтительном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с гетерологичным средством. Соответственно, "конъюгированный" означает связанный посредством ковалентной или ионной связи. Предпочтительно указанное гетерологичное средство представляет собой цитотоксин.

**[0132]** Гетерологичное средство может называться просто "средством" или "активным средством". Например, используя альтернативную терминологию, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут предусматривать активное средство. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связаны с активным средством. В предпочтительном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с активным средством.

**[0133]** Гетерологичное/активное средство может представлять собой лекарственное средство. Предпочтительно гетерологичное/активное вещество представляет собой цитотоксин.

**[0134]** В способах лечения, описанных ниже, особенно предпочтительным является, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению были связаны (например, конъюгированы) с гетерологичным/активным средством.

**[0135]** Средство и/или цитотоксин по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством спейсера (например, по меньшей мере одного спейсера). В одном варианте осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер. В одном варианте осуществления спейсер представляет собой непептидный (например, химический) спейсер.

**[0136]** Цитотоксическое средство или цитотоксин могут представлять собой любую молекулу, известную из уровня техники, которая подавляет функции клеток или препятствует их выполнению, и/или вызывает разрушение клеток (гибель клеток), и/или оказывает противоопухолевые/антипролиферативные эффекты. Известно несколько классов цитотоксических средств, которые потенциально могут использоваться в молекулах ADC. Они включают без ограничения ингибиторы топоизомеразы I, амантины, ауристатины, дауномицины, доксорубицины, дуокармицины, доластатины, ендиины, лекситропсины, таксаны, пурамицины, майтанзиноиды, алкалоиды барвинка, тубулизины и пирролобензодиазепины (PBD). Примерами таких цитотоксических средств являются AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, ауристатин E, паклитаксел, доцетаксел, CC-1065, SN-38, топотекан, морфолинодоксорубицин, ризоксин, цианоморфолинодоксорубицин, доластатин-10, эхиномицин, комбретастин, калихимицин, майтанзин, DM-1, винбластин, метотрексат и нетропсин и их производные и аналоги. Дополнительное раскрытие, касающееся цитотоксинов, подходящих для применения в ADC, можно найти, например, в публикациях международных заявок на патенты № WO 2015/155345 и WO 2015/157592, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0137]** Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с таким гетерологичным средством с обеспечением "конъюгата антитела и лекарственного средства" (ADC).

**[0138]** Средство, как правило, связано с антителом или антигенсвязывающим фрагментом или "нагружено на" них. Нагрузка средства (p) представляет собой среднее

количество средства(средств) на антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, звено, представляющее собой лиганд).

**[0139]** Среднее количество средств на антитело (или антигенсвязывающий фрагмент) в препаратах ADC, полученных посредством реакций конъюгации, может быть охарактеризовано посредством традиционных способов, таких как UV, HPLC с обращенной фазой, HIC, масс-спектрометрия, ELISA-анализ и электрофорез. Количественное распределение ADC с точки зрения  $r$  также может быть определено. Посредством ELISA может быть определено усредненное значение  $r$  в определенном препарате ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). В некоторых случаях разделение, очистка и определение характеристик однородного ADC, где  $r$  представляет собой определенное значение, полученное для ADC с нагрузками другим лекарственным средством, могут осуществляться посредством таких способов, как HPLC с обращенной фазой или электрофорез. Такие методики также применимы в отношении других типов конъюгатов.

**[0140]** Аминокислоты, представляющие собой цистеин, могут быть сконструированы в реакционноспособных сайтах антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента), а также предпочтительно таким образом, чтобы они не образовывали внутрицепочечных или межмолекулярных дисульфидных связей (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249). Тиольные группы сконструированных остатков цистеина способны реагировать с линкером в средстве (например, формулы I ниже), которые могут содержать реакционноспособные в отношении тиола электрофильные группы, такие как малеимид или альфа-галогенамиды, с образованием ADC с антителами со сконструированными остатками цистеина. Местоположение звена, представляющего собой лекарственное средство, таким образом, может быть разработанным, контролируемым и известным. Нагрузку лекарственным средством можно контролировать, так как тиольные группы сконструированного цистеина, как правило, реагируют с реагентами лекарственное средство-линкер с высоким выходом. Конструирование антитела IgG с введением аминокислоты, представляющей собой цистеин, посредством замены в одном сайте на тяжелой или легкой цепи обеспечивает получение двух новых остатков цистеина на симметричном антителе. Нагрузка лекарственным средством, близкая к 2, может быть достигнута с почти однородностью продукта конъюгации ADC.

**[0141]** В случае, если более чем одна нуклеофильная или электрофильная группа антитела или его антигенсвязывающего фрагмента реагирует со средством, полученный

продукт может представлять собой смесь соединений ADC с распределением звеньев, представляющих собой средство, присоединенных к антителу, например, 1, 2, 3 и т. д. Посредством способов жидкостной хроматографии, таких как хроматография с полимерной обращенной фазой (PLRP) и хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC), можно разделять соединения в смеси по значению нагрузки средством. Препараты ADC с одним значением (p) нагрузки средством могут быть выделены.

**[0142]** Таким образом, композиции на основе конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут содержать смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат один или несколько фрагментов, представляющих собой средство, и где фрагменты, представляющие собой средство, могут быть присоединены к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по разным аминокислотным остаткам.

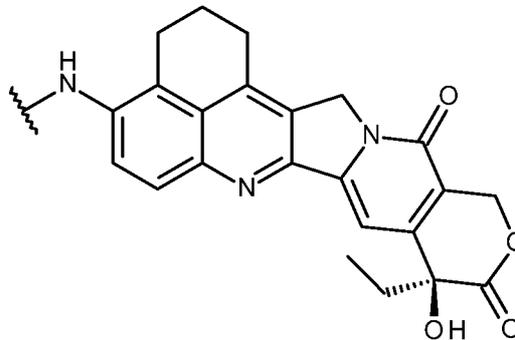
**[0143]** В одном варианте осуществления среднее количество средств на антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления диапазон выбран из диапазона от 1 до 10, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6 и от 4 до 10. В некоторых вариантах осуществления присутствует одно средство на антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент). В некоторых вариантах осуществления количество средств на антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть выражено в виде соотношения средства (т. е. лекарственного средства) и антитела. Данное соотношение называется соотношением лекарственного средства и антитела (DAR). "DAR представляет собой среднее количество лекарственных средств (т. е. средств), связанных с каждым антителом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения DAR находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления диапазон DAR выбран из диапазонов от 1 до 10, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6 и от 4 до 10. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения DAR составляет приблизительно 8. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения DAR составляет 8.

**[0144]** В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими гетерологичными средствами, выбранными из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулизина, пирролобензодиазепина, противомикробного средства, терапевтического средства, пролекарства, пептида, белка, фермента, липида, модификатора биологического ответа, фармацевтического средства, лимфокина, гетерологичного антитела, фрагмента гетерологичного антитела, выявляемой метки, полиэтиленгликоля (PEG), радиоактивного изотопа или их комбинации.

**[0145]** В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела конъюгирован с одним или несколькими цитотоксинами, выбранными из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулизина, пирролобензодиазепина или их комбинации. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими цитотоксинами, выбранными из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I SG3932, SG4010, SG4057 или SG4052 (структуры которых приведены ниже); тубулизина AZ1508, пирролобензодиазепина SG3315, пирролобензодиазепина SG3249 или их комбинации.

**[0146]** Предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могли быть конъюгированы с ингибитором топоизомеразы I. Ингибиторы топоизомеразы представляют собой химические соединения, которые блокируют действие топоизомеразы (топоизомеразы I и II), которая представляет собой тип фермента, который контролирует изменения в структуре ДНК посредством катализа разрыва и восстановления фосфодиэфирного остова нитей ДНК в ходе нормального клеточного цикла.

**[0147]** Общий пример подходящего ингибитора топоизомеразы I представлен следующим соединением:

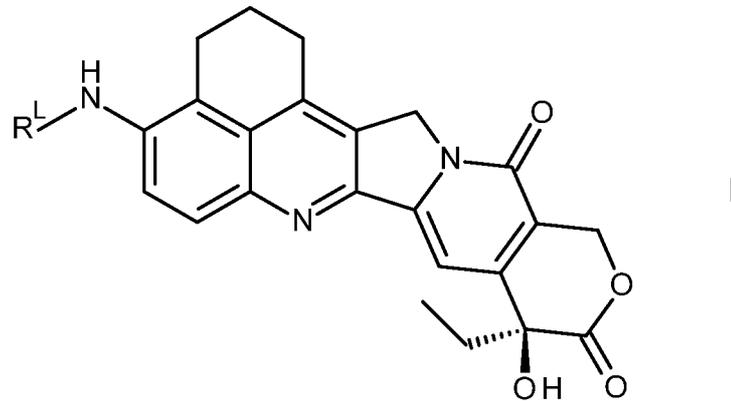


**A\***

Указанное соединение обозначено как A\* и может называться в данном документе "звено, представляющее собой лекарственное средство".

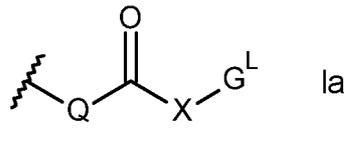
**[0148]** Соединение (например, A\*) предпочтительно представлено с линкером для соединения (предпочтительно конъюгирования) с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (оно может называться "звеном, представляющим собой лиганд"). Соответственно, линкер присоединен (например, конъюгирован) с возможностью расщепления к аминокислотному остатку, например аминокислоте антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе.

[0149] Более конкретно пример подходящего ингибитора топоизомеразы I представлен следующим соединением с формулой "I":



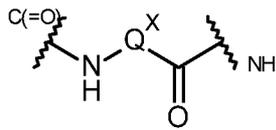
и его солями и сольватами, где  $R^L$  представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд), где указанный линкер предпочтительно выбран из

(ia):



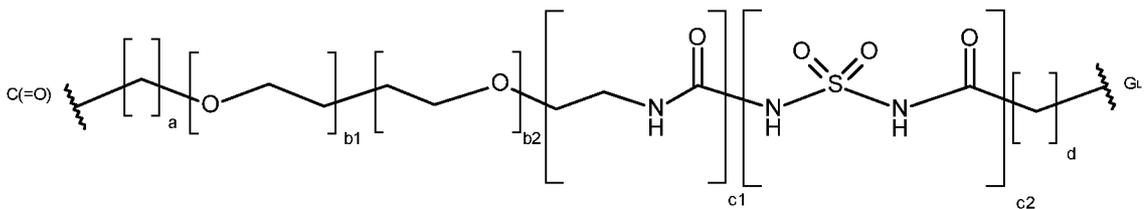
где

Q представляет собой:



, где  $Q^X$  является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

X представляет собой:

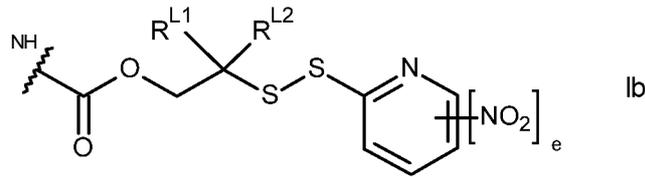


где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0

(т. е. только один из b1 и b2 может не равняться 0), и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0 (т. е. только один из c1 и c2 может не равняться 0);

$G^L$  представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд); или

(ib):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и

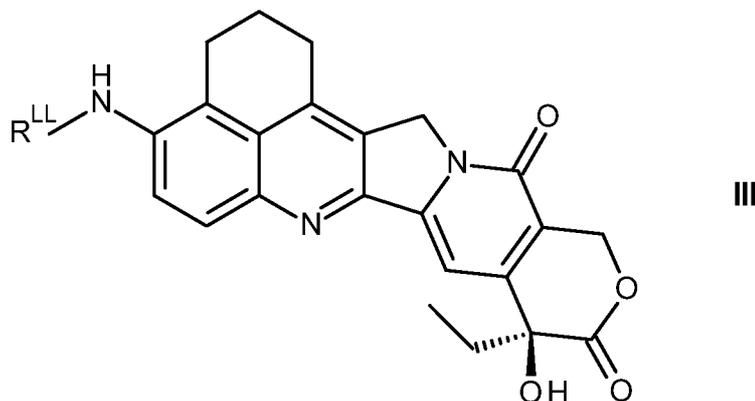
e равняется 0 или 1.

**[0150]** Специалисту в данной области техники будет понятно, что с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом может быть конъюгировано более чем одно из указанных средств (например, ингибитор топоизомеразы I).

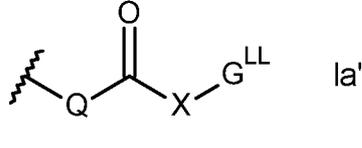
**[0151]** Например, конъюгат (например, конъюгат антитела и лекарственного средства) по настоящему изобретению может представлять собой таковой с общей формулой IV,



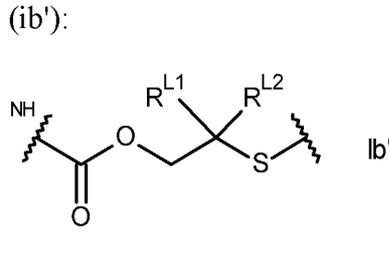
или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, звено, представляющее собой лиганд),  $D^L$  представляет собой ингибитор топоизомеразы I с линкером (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер) формулы III,



$R^{LL}$  представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд), где линкер предпочтительно выбран из (ia'):



где Q и X являются такими, как определено выше, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд); и



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено выше; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

**[0152]** Нагрузка лекарственным средством представлена с помощью p, количества ингибитора(ингибиторов) топоизомеразы I (например, звеньев, представляющих собой лекарственное средство) на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, звено, представляющее собой лиганд). Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 20 звеньев, представляющих собой лекарственное средство (D), на звено, представляющее собой лиганд. В случае композиций p представляет собой среднюю нагрузку лекарственным средством для конъюгатов в композиции, и p находится в диапазоне от 1 до 20.

**[0153]** Соответственно, автором настоящего изобретения предусмотрен конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например звено, представляющее собой лиганд), ковалентно связанные с по меньшей мере одним ингибитором топоизомеразы I (например, звеном, представляющим собой лекарственное средство, таким как  $A^*$ , проиллюстрированное выше). Указанный ингибитор предпочтительно связан с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера (например, звена, представляющего собой линкер), такого как линкер, описанный выше как  $R^L$  и/или  $R^{LL}$ . Другими словами, настоящее изобретение охватывает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в

данном документе (например звено, представляющее собой лиганд), с одним или несколькими присоединенными ингибиторами топоизомеразы I, предпочтительно посредством линкера (например звена, представляющего собой лекарственное средство-линкер). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (представляющие собой звено, представляющее собой лиганд), описанные более полно выше, представляют собой обеспечивающее нацеливание средство, которое связывается с фрагментом-мишенью. Более конкретно данное звено, представляющее собой лиганд, может, например, конкретно связываться с B7-H4 на клетке-мишени, к которой звено, представляющее собой лекарственное средство, таким образом доставляется. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрены способы лечения, например, различных видов рака и других нарушений с помощью ADC (например, видов рака/нарушений, которые ассоциированы с присутствием клеток, предпочтительно раковых клеток, которые экспрессируют B7-H4).

#### Дополнительные предпочтения

**[0154]** Некоторые признаки ингибиторов топоизомеразы I, описанные выше, являются особенно предпочтительными и могут быть определены более подробно, как изложено ниже. В качестве примера будет приведен предпочтительный вариант осуществления признака Q<sup>x</sup> (например, в линкере 1a, описанном выше).

**[0155]** Следующие предпочтения можно применять ко всем аспектам настоящего изобретения, как описано выше, или они могут относиться к отдельному аспекту. Предпочтения могут быть объединены вместе в любой комбинации.

**[0156]** Различные определения, которые касаются определенных терминов в данном разделе, представлены под заголовком "Определения", как приведено ниже.

#### Q<sup>x</sup>

**[0157]** В одном варианте осуществления Q представляет собой аминокислотный остаток. Аминокислота может представлять собой природную аминокислоту или неприродную аминокислоту. Например, Q может быть выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

**[0158]** В одном варианте осуществления Q включает дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления дипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то дипептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, дипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

**[0159]** В одном варианте осуществления Q выбран из



где Cit представляет собой цитруллин.

**[0160]** Предпочтительно Q выбран из



**[0161]** Более предпочтительно Q выбран из  $\text{NH-Phe-Lys-C=O}$ ,  $\text{NH-Val-Cit-C=O}$  или  $\text{NH-Val-Ala-C=O}$ .

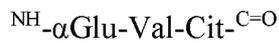
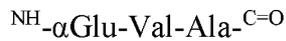
**[0162]** Другие подходящие комбинации дипептидов включают:



**[0163]** Могут применяться другие комбинации дипептидов, в том числе комбинации, описанные в Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, которая включена в данный документ посредством ссылки.

**[0164]** В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и не природных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то трипептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, трипептид

представляет собой сайт распознавания для катепсина. Трипептидные линкеры, представляющие особый интерес, представляют собой:

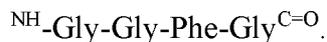


**[0165]** В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой тетрапептидный остаток. Аминокислоты в тетрапептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления тетрапептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то тетрапептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, тетрапептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

Тетрапептидные линкеры, представляющие особый интерес, представляют собой:

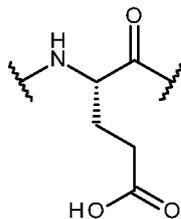


**[0166]** В некоторых вариантах осуществления тетрапептид представляет собой

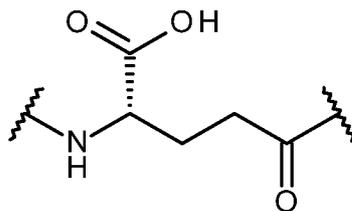


**[0167]** На представленных выше изображениях пептидных остатков  $\text{NH-}$  представляет собой N-конец, и  $\text{-C=O}$  представляет собой C-конец остатка. C-конец связан с NH из A\*.

**[0168]** Glu представляет собой остаток глутаминовой кислоты, т. е.



$\alpha\text{Glu}$  представляет собой остаток глутаминовой кислоты при связывании посредством  $\alpha$ -цепи, т. е.:

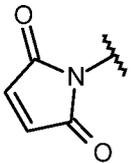
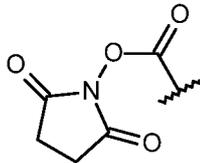
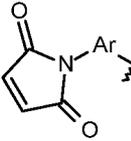
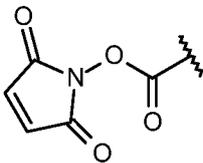
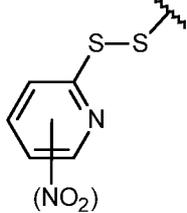
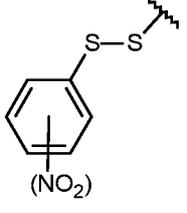
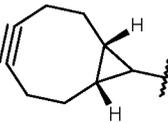


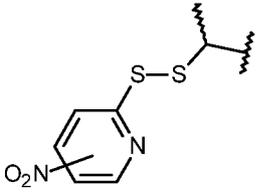
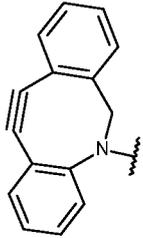
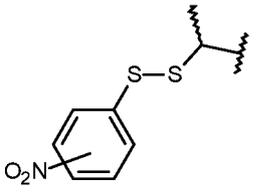
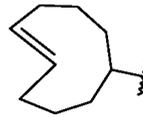
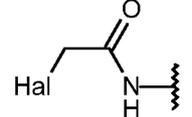
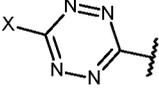
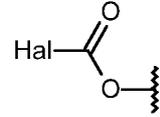
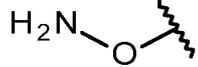
**[0169]** В одном варианте осуществления при необходимости боковая цепь аминокислоты является химически защищенной. Защитная группа для боковой цепи может представлять собой группу, рассмотренную выше. Защищенные аминокислотные последовательности являются расщепляемыми с помощью ферментов. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с защитой боковой цепи с помощью Boc, является расщепляемой с помощью катепсина.

**[0170]** Защитные группы для боковых цепей аминокислот широко известны из уровня техники, описаны в каталоге Novabiochem и являются такими, как описано выше.

$G^L$

**[0171]**  $G^L$  может быть выбран из

$(G^{L1-1})$		$(G^{L6})$	
$(G^{L1-2})$		$(G^{L7})$	
$(G^{L2})$		$(G^{L8})$	
$(G^{L3-1}),$	 где группа NO <sub>2</sub> является необязательной	$(G^{L9})$	
$(G^{L3-2}),$	 где группа NO <sub>2</sub> является необязательной	$(G^{L10})$	

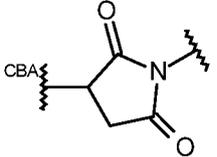
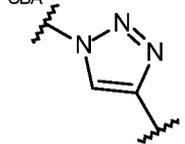
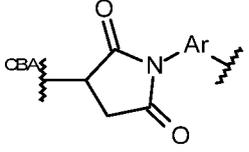
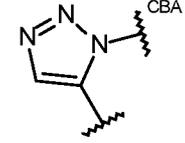
(G <sup>L3-3</sup> ),  где группа NO <sub>2</sub> является необязательной		(G <sup>L11</sup> ) 	
(G <sup>L3-4</sup> ),  где группа NO <sub>2</sub> является необязательной		(G <sup>L12</sup> ) 	
(G <sup>L4</sup> ),  где Hal = I, Br, Cl		(G <sup>L13</sup> ) 	
(G <sup>L5</sup> ) 		(G <sup>L14</sup> ) 	

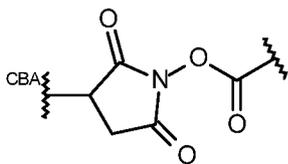
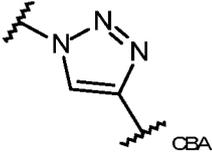
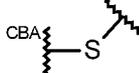
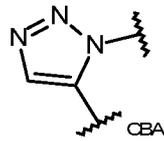
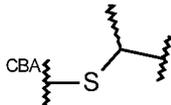
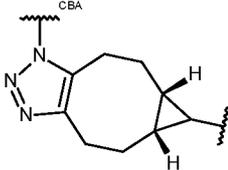
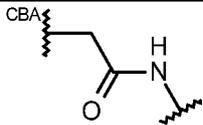
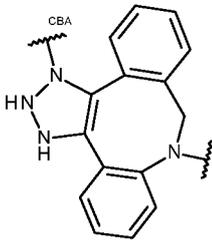
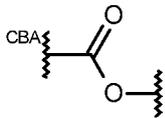
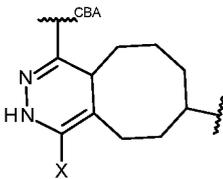
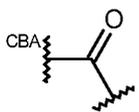
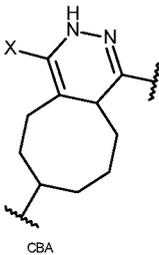
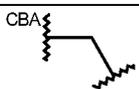
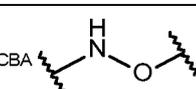
где Ar представляет собой C<sub>5</sub>-ариленовую группу, например фенилен, и X представляет собой C<sub>1</sub>-алкил.

[0172] В некоторых вариантах осуществления G<sup>L</sup> выбран из G<sup>L1-1</sup> и G<sup>L1-2</sup>. В некоторых из данных вариантов осуществления G<sup>L</sup> представляет собой G<sup>L1-1</sup>.

G<sup>LL</sup>

[0173] G<sup>LL</sup> может быть выбран из:

(G <sup>LL1-1</sup> ) 		(G <sup>LL8-1</sup> ) 	
(G <sup>LL1-2</sup> ) 		(G <sup>LL8-2</sup> ) 	

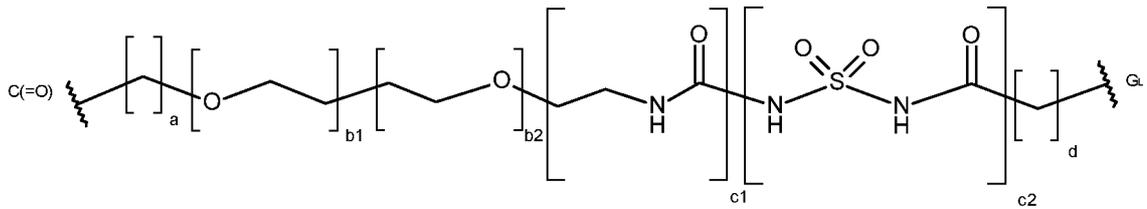
(G <sup>LL2</sup> )		(G <sup>LL9-1</sup> )	
(G <sup>LL3-1</sup> )		(G <sup>LL9-2</sup> )	
(G <sup>LL3-2</sup> )		(G <sup>LL10</sup> )	
(G <sup>LL4</sup> )		(G <sup>LL11</sup> )	
(G <sup>LL5</sup> )		(G <sup>LL12</sup> )	
(G <sup>LL6</sup> )		(G <sup>LL13</sup> )	
(G <sup>LL7</sup> )		(G <sup>LL14</sup> )	

где Ar представляет собой C<sub>5-6</sub>ариленовую группу, например фенилен, и X представляет собой C<sub>1-4</sub>алкил.

[0174] В некоторых вариантах осуществления G<sup>LL</sup> выбран из G<sup>LL1-1</sup> и G<sup>LL1-2</sup>. В некоторых из данных вариантов осуществления G<sup>LL</sup> представляет собой G<sup>LL1-1</sup>.

X

[0175] X предпочтительно представляет собой:



где  $a$  равняется 0-5,  $b_1$  равняется 0-16,  $b_2$  равняется 0-16,  $c$  равняется 0 или 1,  $d$  равняется 0-5, где по меньшей мере  $b_1$  или  $b_2$  равняется 0, и по меньшей мере  $c_1$  или  $c_2$  равняется 0.

$a$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $a$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $a$  равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления  $a$  равняется 0.

$b_1$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления  $b_1$  равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b_1$  равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

$b_2$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления  $b_2$  равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b_2$  равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8. Предпочтительно только один из  $b_1$  и  $b_2$  может не равняться 0.

$c_1$  может равняться 0 или 1.  $c_2$  может равняться 0 или 1. Предпочтительно только один из  $c_1$  и  $c_2$  может не равняться 0.

$d$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $d$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $d$  равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления  $d$  равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления  $d$  равняется 5.

**[0176]** В некоторых вариантах осуществления X  $a$  равняется 0,  $b_1$  равняется 0,  $c_1$  равняется 1,  $c_2$  равняется 0, и  $d$  равняется 2, и  $b_2$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b_2$  равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах осуществления X  $a$  равняется 1,  $b_2$  равняется 0,  $c_1$  равняется 0,  $c_2$  равняется 0, и  $d$  равняется 0, и  $b_1$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b_1$  равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах осуществления X  $a$  равняется 0,  $b_1$  равняется 0,  $c_1$  равняется 0,  $c_2$  равняется 0, и  $d$  равняется 1, и  $b_2$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b_2$  равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах осуществления X  $b_1$  равняется 0,  $b_2$  равняется 0,  $c_1$  равняется 0,  $c_2$  равняется 0, и один из  $a$  и  $d$  равняется 0. Другой из  $a$  и  $d$  равняется 1-5. В некоторых из данных вариантов осуществления другой из  $a$  и  $d$  равняется 1. В других из данных

вариантов осуществления другой из a и d равняется 5. В некоторых вариантах осуществления X a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 1, d равняется 2, и b1 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

**[0177]** В некоторых вариантах осуществления  $R^L$  представлен формулой Ib. В некоторых вариантах осуществления  $R^{LL}$  представлен формулой Ib'.

**[0178]**  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  могут быть независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

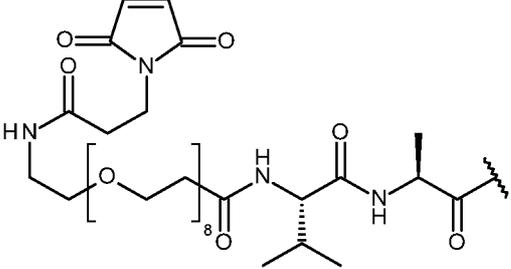
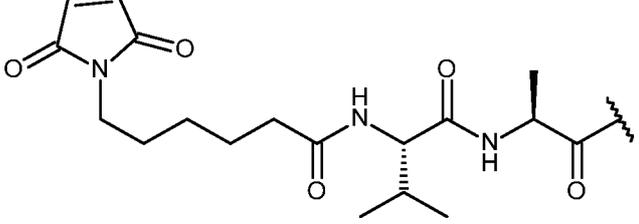
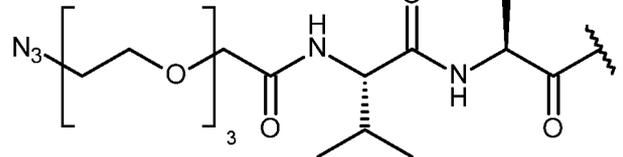
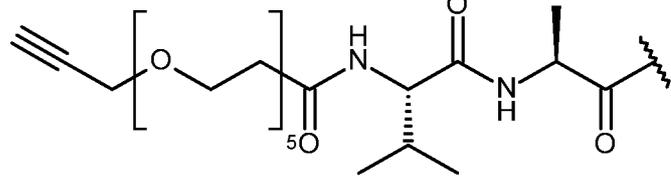
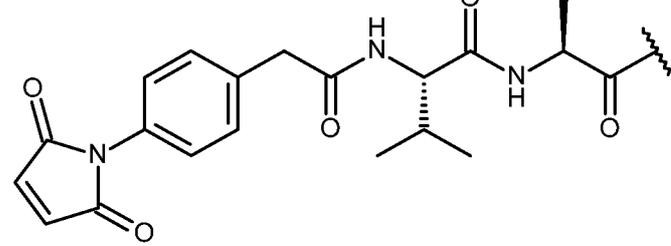
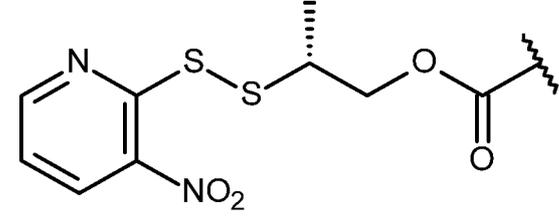
**[0179]** В некоторых вариантах осуществления оба из  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  представляют собой H. В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  представляет собой H, и  $R^{L2}$  представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  одновременно представляют собой метил.

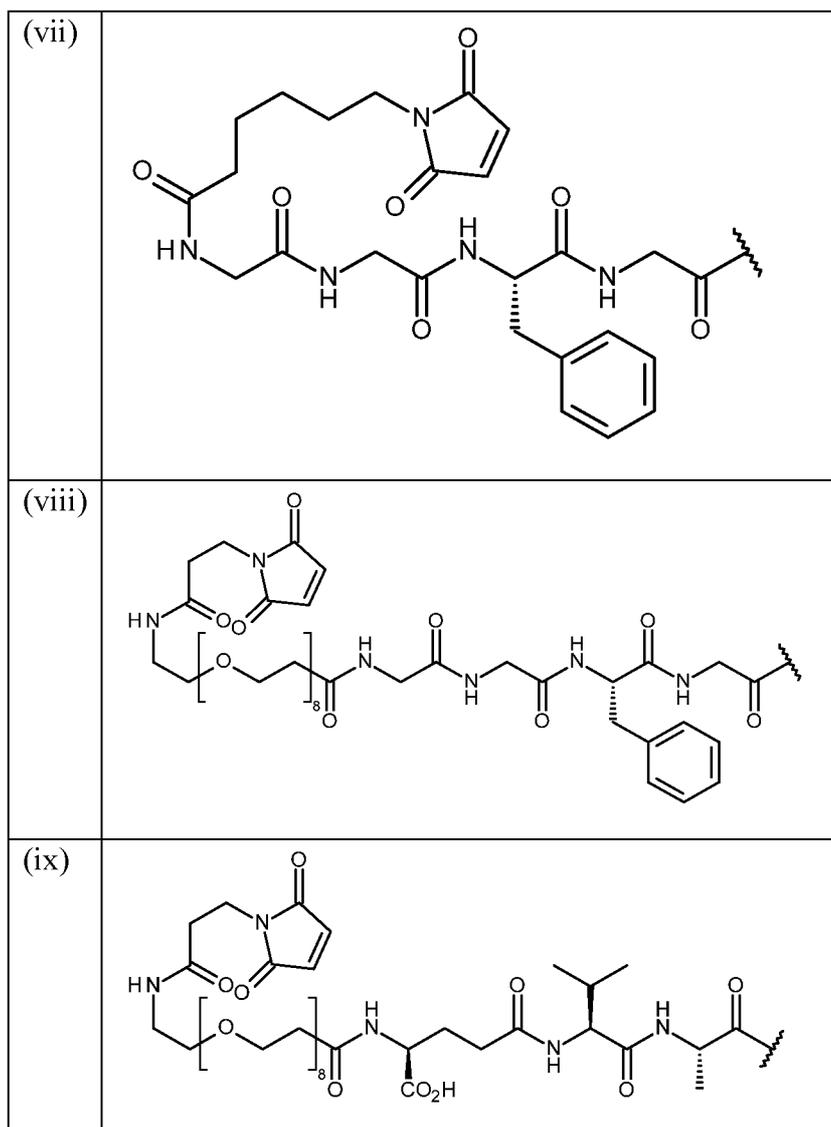
**[0180]** В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу. В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

**[0181]** В группе Ib в некоторых вариантах осуществления e равняется 0. В других вариантах осуществления e равняется 1, и нитрогруппа может находиться в любом доступном положении кольца. В некоторых из таких вариантов осуществления она находится в орто-положении. В других из данных вариантов осуществления она находится в пара-положении.

**[0182]** В некоторых вариантах осуществления, где соединения, описанные в данном документе, представлены в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме, энантиомерно обогащенная форма характеризуется энантиомерным соотношением, составляющим более 60:40, 70:30, 80:20 или 90:10. В дополнительных вариантах осуществления соотношение энантиомеров составляет более чем 95:5, 97:3 или 99:1.

**[0183]** В некоторых вариантах осуществления  $R^L$  выбран из:

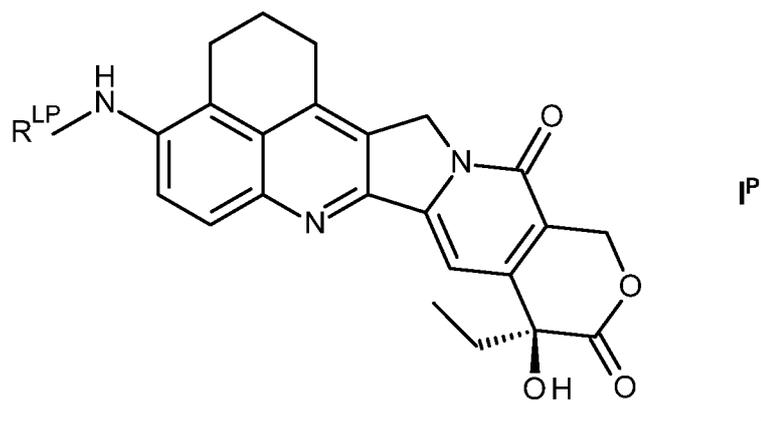
(i)	
(ii)	
(iii)	
(iv)	
(v)	
(vi)	



**[0184]** В некоторых вариантах осуществления  $R^{LL}$  представляет собой группу, полученную из групп  $R^L$ , указанных выше.

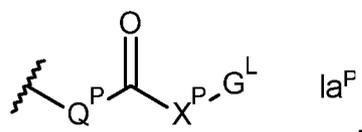
**[0185]** Учитывая приведенные вышеуказанные предпочтения, далее будут описаны определенные предпочтительные формулы топоизомераза I-линкер (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер).

**[0186]** В некоторых вариантах осуществления соединение формулы **I** представляет собой соединение формулы **I<sup>P</sup>**:



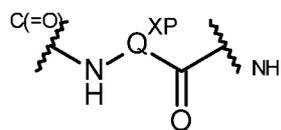
и его соли и сольваты, где  $R^{LP}$  представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, где указанный линкер выбран из

(ia):



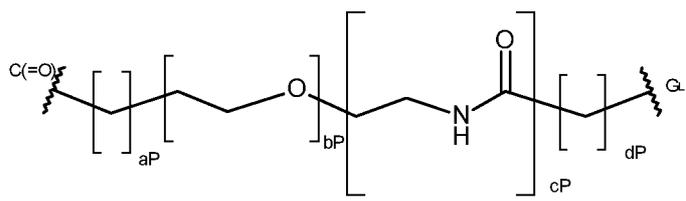
где

$Q^P$  представляет собой:



, где  $Q^{XP}$  является таким, что  $Q^P$  представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

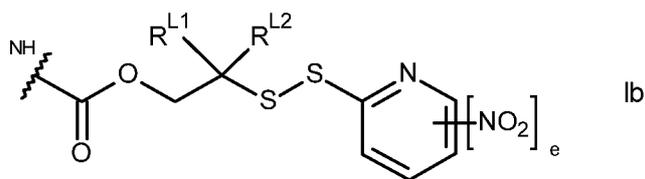
$X^P$  представляет собой:



где  $aP$  равняется 0-5,  $bP$  равняется 0-16,  $cP$  равняется 0 или 1,  $dP$  равняется 0-5;

$G^L$  представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд);

(ib):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и

$e$  равняется 0 или 1.

$aP$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $aP$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $aP$  равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления  $aP$  равняется 0.

$bP$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления  $bP$  равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления  $bP$  равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 4 или 8.

$cP$  может равняться 0 или 1.

$dP$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $dP$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $dP$  равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления  $dP$  равняется 2.

**[0187]** В некоторых вариантах осуществления  $X^P$   $aP$  равняется 0,  $cP$  равняется 1, и  $dP$  равняется 2, и  $bP$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $bP$  равняется 0, 4 или 8.

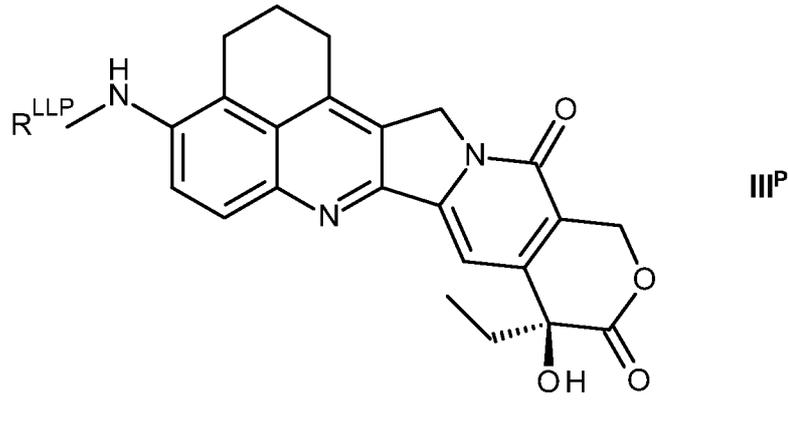
**[0188]** Предпочтения, касающиеся  $Q^X$ , указанного выше для соединений формулы **I**, могут применяться в отношении  $Q^{XP}$  (например, при необходимости).

**[0189]** Предпочтения, касающиеся  $G^L$ ,  $R^{L1}$ ,  $R^{L2}$  и  $e$ , указанных выше для соединений формулы **I**, могут применяться в отношении соединений формулы **I<sup>P</sup>**.

**[0190]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы **IV** представляет собой конъюгат формулы **IV<sup>P</sup>**:

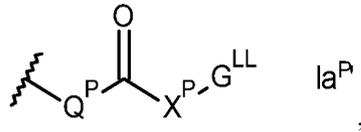


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где  $L$  представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, звено, представляющее собой лиганд),  $D^{LP}$  представляет собой ингибитор топоизомеразы I (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер) формулы **III<sup>P</sup>**:



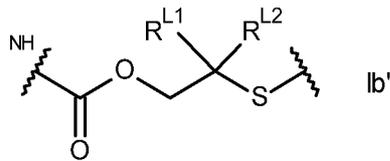
$R^{LLP}$  представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, звеном, представляющим собой лиганд), где указанный линкер выбран из

(ia'):



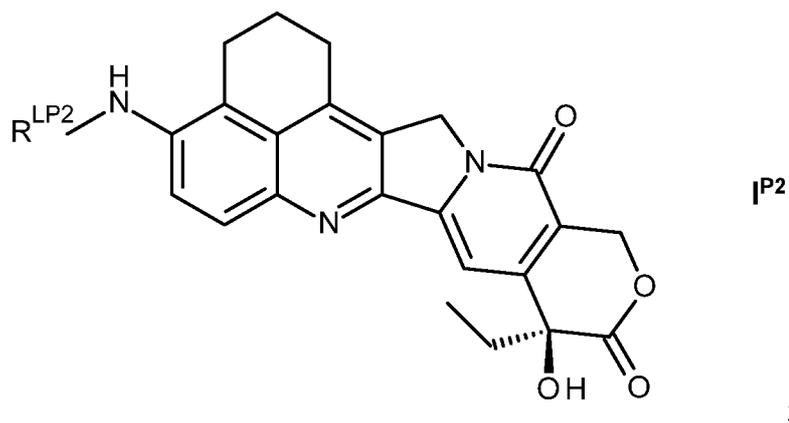
где  $Q^P$  и  $X^P$  являются такими, как определено выше, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд); и

(ib'):



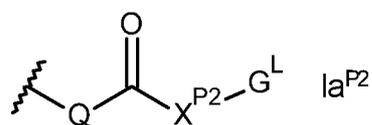
где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено выше; и  $r$  представляет собой целое число от 1 до 20.

**[0191]** В некоторых вариантах осуществления соединение формулы **I** представляет собой соединение формулы **I<sup>P2</sup>**:



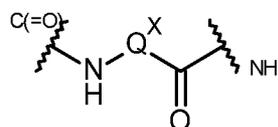
и его соли и сольваты, где  $R^{LP2}$  представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, где указанный линкер выбран из

(ia):



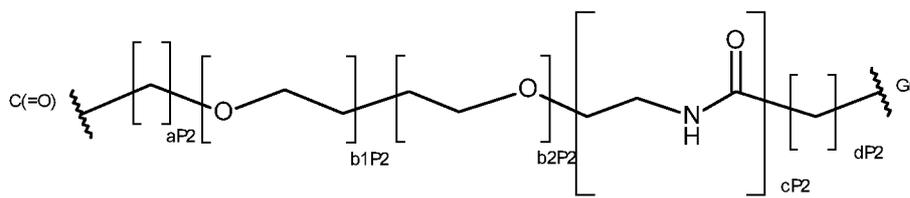
где

Q представляет собой:



, где  $Q^X$  является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

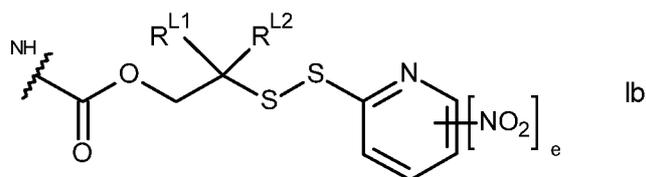
$X^{P2}$  представляет собой:



где  $aP2$  равняется 0-5,  $b1P2$  равняется 0-16,  $b2P2$  равняется 0-16,  $cP2$  равняется 0 или 1,  $dP2$  равняется 0-5, где по меньшей мере  $b1P2$  или  $b2P2$  равняется 0 (т. е. только один из  $b1$  и  $b2$  может не равняться 0);

$G^L$  представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд);

(ib):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и

$e$  равняется 0 или 1.

**[0192]**  $aP2$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $aP2$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $aP2$  равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления  $aP2$  равняется 0.

**[0193]**  $b1P2$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления  $b1P2$  равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b1P2$  равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

**[0194]**  $b2P2$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления  $b2P2$  равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b2P2$  равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

**[0195]** Предпочтительно только один из  $b1P2$  и  $b2P2$  может не равняться 0.

**[0196]**  $cP2$  может равняться 0 или 1.

**[0197]**  $dP2$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $dP2$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $dP2$  равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления  $dP2$  равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления  $dP2$  равняется 5.

**[0198]** В некоторых вариантах осуществления  $X^{P2}$   $aP2$  равняется 0,  $b1P2$  равняется 0,  $cP2$  равняется 1, и  $dP2$  равняется 2, и  $b2P2$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b2P2$  равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах осуществления  $X^{P2}$   $aP2$  равняется 1,  $b2P2$  равняется 0,  $cP2$  равняется 0, и  $dP2$  равняется 0, и  $b1P2$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b1P2$  равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах осуществления  $X^{P2}$   $aP2$  равняется 0,  $b1P2$  равняется 0,  $cP2$  равняется 0, и  $dP2$  равняется 1, и  $b2P2$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $b2P2$  равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых вариантах осуществления  $X^{P2}$   $b1P2$  равняется 0,  $b2P2$  равняется 0,  $cP2$  равняется 0, и один из  $aP2$  и  $dP2$  равняется 0. Другой из  $aP2$  и  $d$  равняется 1-5. В

некоторых из данных вариантов осуществления другой из aP2 и d равняется 1. В других из данных вариантов осуществления другой из aP2 и dP2 равняется 5.

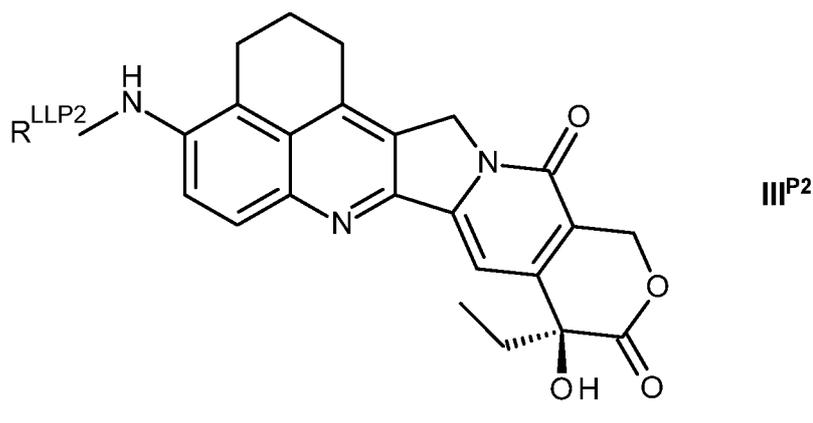
[0199] Предпочтения, касающиеся  $Q^X$ , указанного выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении  $Q^X$  в формуле Ia<sup>P2</sup> (например, при необходимости).

[0200] Предпочтения, касающиеся  $G^L$ ,  $R^{L1}$ ,  $R^{L2}$  и e, указанных выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении соединений формулы I<sup>P2</sup>.

[0201] В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы IV представляет собой конъюгат формулы IV<sup>P2</sup>:

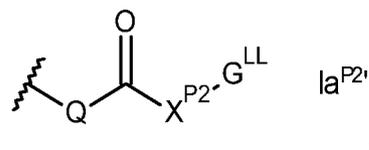


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, звено, представляющее собой лиганд),  $D^{LP2}$  представляет собой ингибитор топоизомеразы I (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер) формулы III<sup>P2</sup>:



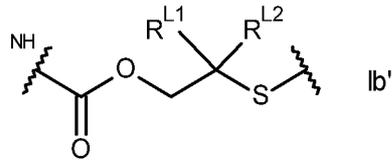
$R^{LLP2}$  представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, звеном, представляющим собой лиганд), где указанный линкер выбран из

(ia'):



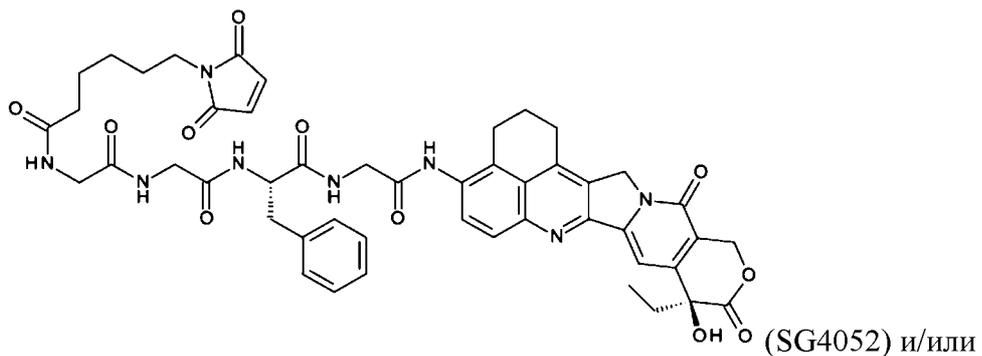
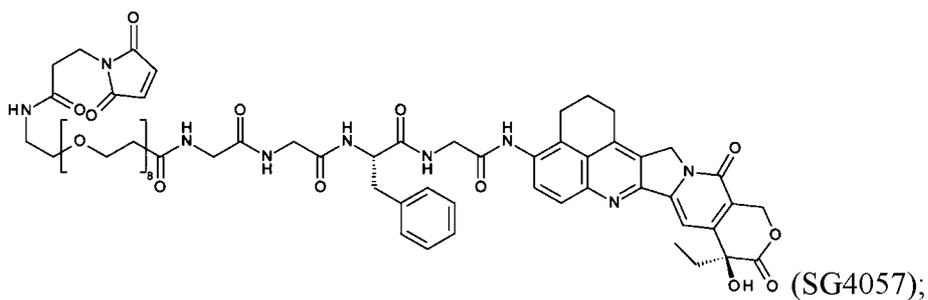
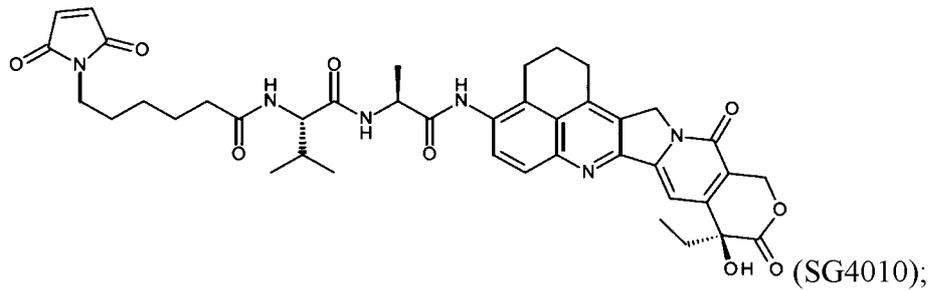
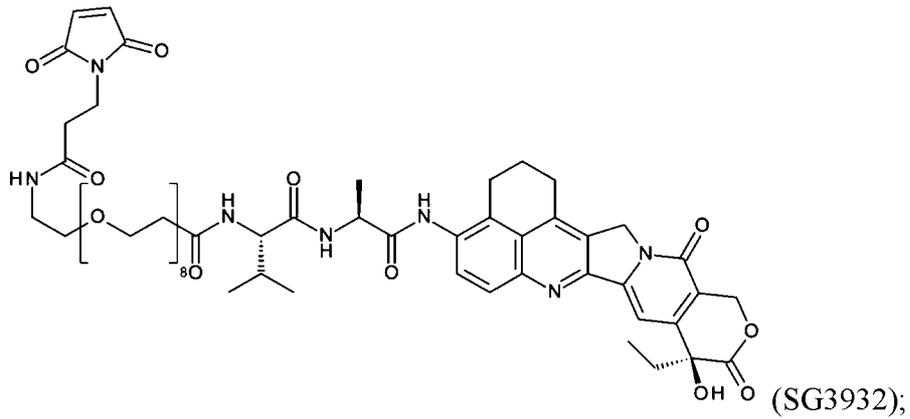
где Q и  $X^{P2}$  являются такими, как определено выше, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; и

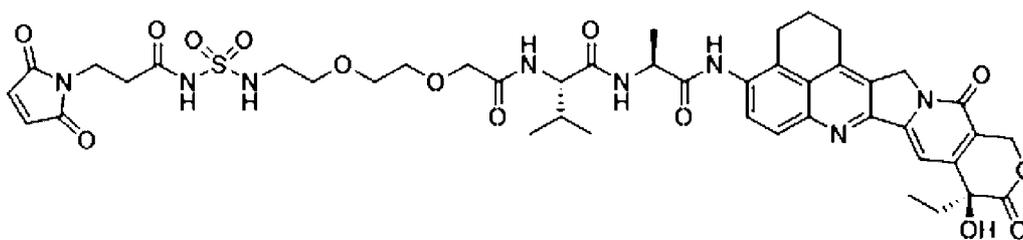
(ib'):



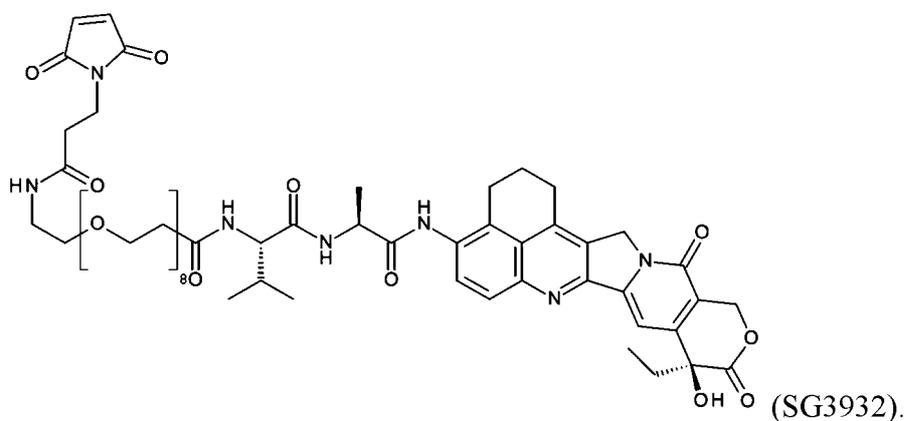
где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено выше; и  $n$  представляет собой целое число от 1 до 20.

**[0202]** Особенно подходящие ингибиторы топоизомеразы I включают те, которые характеризуются следующими формулами:

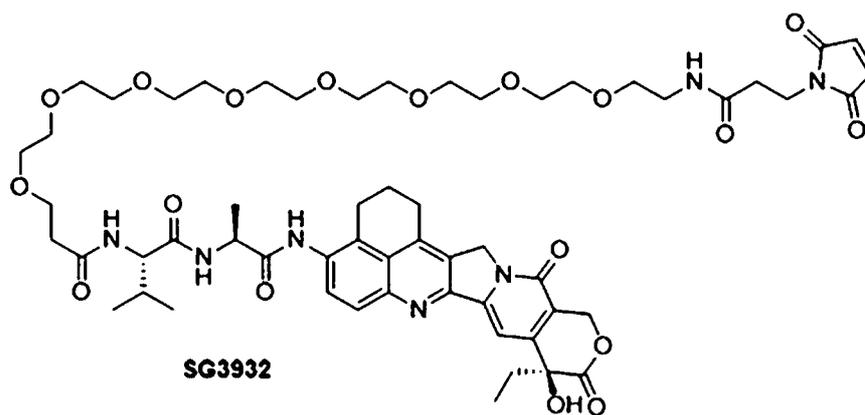




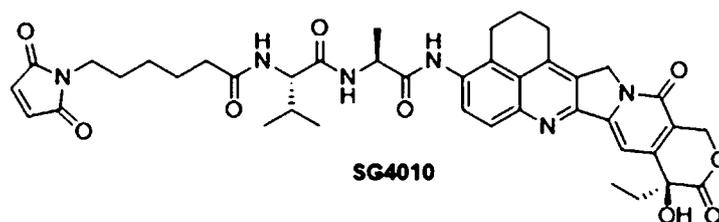
[0203] SG3932 является особенно предпочтительным. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, конъюгированы с ингибитором топоизомеразы I, характеризующимся следующей формулой (например, SG3932):



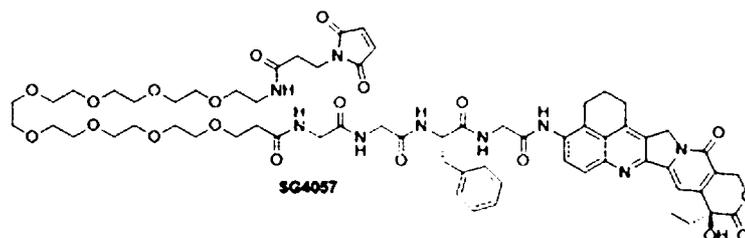
[0204] Во избежание неоднозначности толкования, цифра '8' определяет, что структура в квадратных скобках повторяется восемь раз. Таким образом, другим представлением SG3932 является:



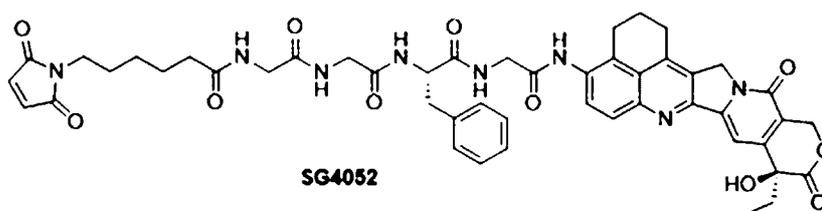
[0205] Другим представлением SG4010 является:



[0206] Другим представлением SG4057 является:



[0207] Другим представлением SG4052 является:



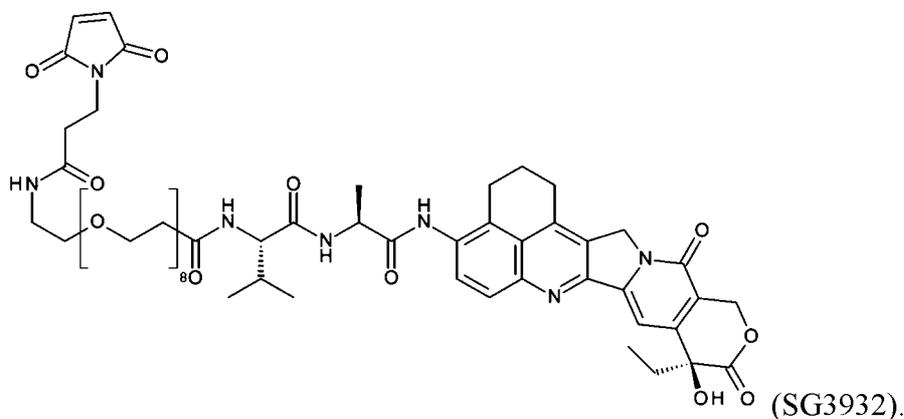
[0208] Любые антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, можно конъюгировать с одним или несколькими из указанных ингибиторов топоизомеразы I.

[0209] В предпочтительном аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4 (например, эпитопом полипептида B7-H4), содержащие:

- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или ее функциональный вариант;
- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11 или ее функциональный вариант; и

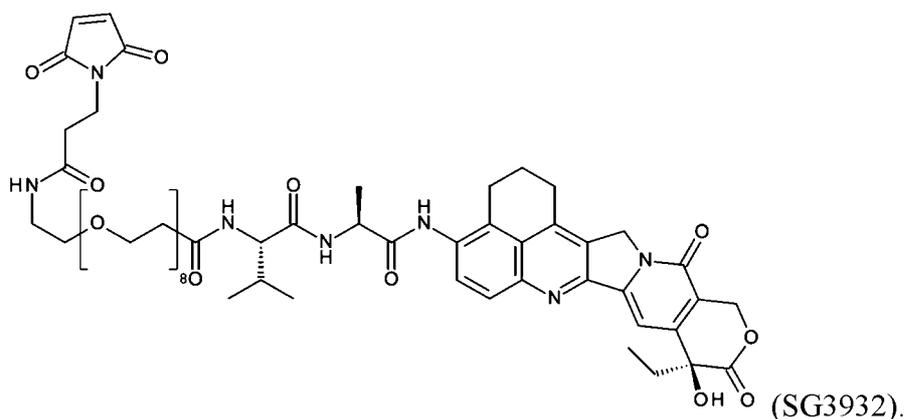
vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с SG3932:



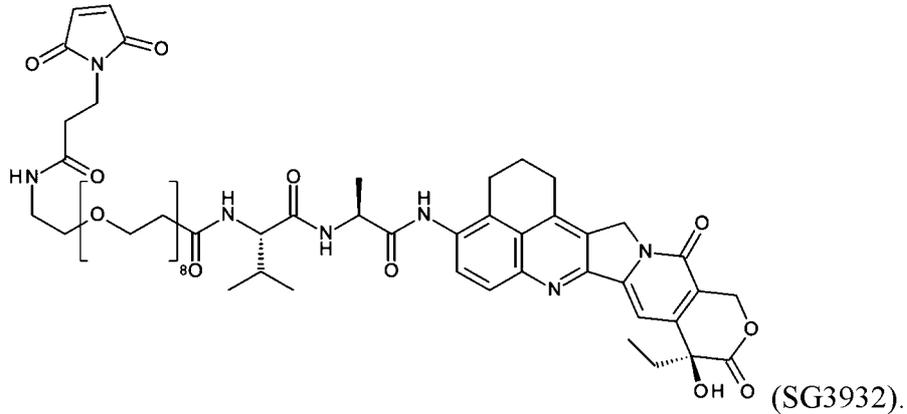
**[0210]** В другом предпочтительном аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с SG3932:



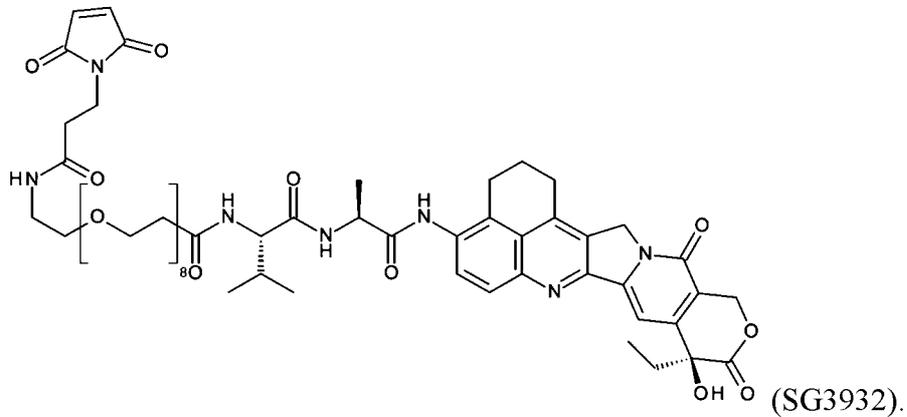
**[0211]** В особенно предпочтительном аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с SG3932:



**[0212]** В другом предпочтительном аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51 или ее функциональный вариант; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант;

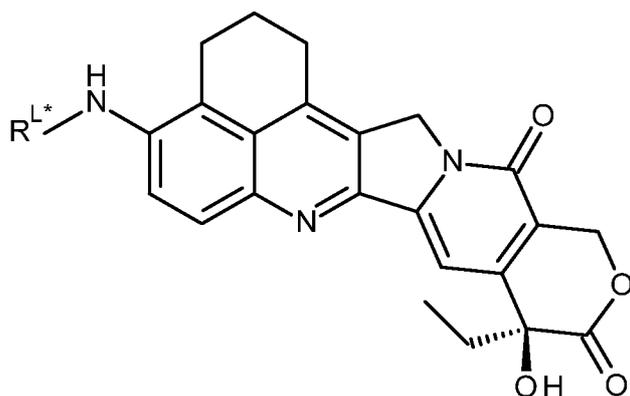
где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с SG3932:



#### Синтез ингибиторов топоизомеразы I

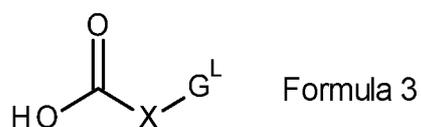
**[0213]** Для полноты далее будет описаны определенные общие пути синтеза для получения предпочтительного(предпочтительных) ингибитора(ингибиторов) топоизомеразы I. Дополнительные подробности можно найти в разделе "Примеры".

**[0214]** Соединения формулы I, где  $R^L$  представлен формулой Ia, могут быть синтезированы из соединения формулы 2:



Formula 2

где  $R^{L*}$  представляет собой  $-QH$  за счет присоединения к соединению формулы 3:

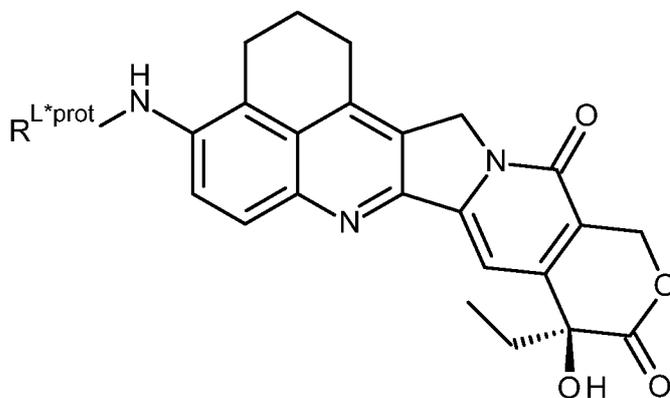


Formula 3

или его активированную версию.

**[0215]** Такую реакцию можно осуществлять в условиях, способствующих образованию амидной связи.

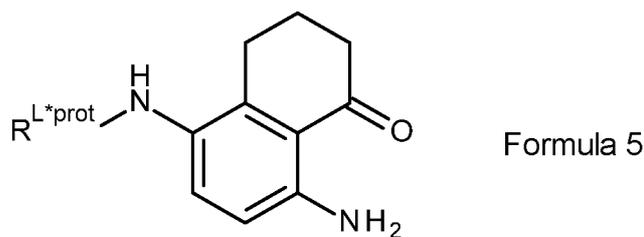
**[0216]** Соединения формулы 2 можно синтезировать посредством удаления защитной группы из соединения формулы 4:



Formula 4

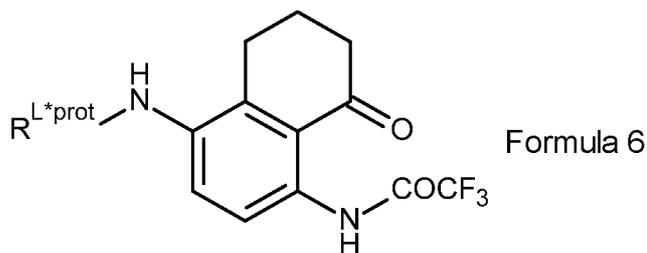
где  $R^{L*prot}$  представляет собой  $-Q-Prot^N$ , где  $Prot^N$  представляет собой защитную группу для аминогруппы.

**[0217]** Соединения формулы 4 могут быть синтезированы посредством реакции сочетания соединения формулы 5:



с соединением А3 с применением реакции Фридлендера.

**[0218]** Соединения формулы 5 можно синтезировать из соединений формулы 6:



посредством удаления трифторацетамидной защитной группы.

**[0219]** Соединения формулы 6 можно синтезировать посредством реакции сочетания  $R^{L*prot}\text{-OH}$  с соединением I7.

**[0220]** Соединения формулы I, где  $R^L$  представлен формулой Ia или Ib, можно синтезировать из соединения I11 посредством реакции сочетания с соединением  $R^L\text{-OH}$  или его активированной формой.

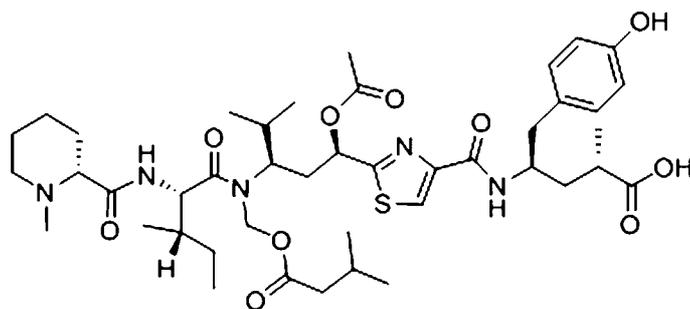
Защитные группы для аминогруппы

**[0221]** Защитные группы для аминогруппы широко известны специалистам в данной области техники. Особое внимание обращается на раскрытие подходящих защитных групп в Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, четвертое издание, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), страницы 696-871.

Дополнительные ADC

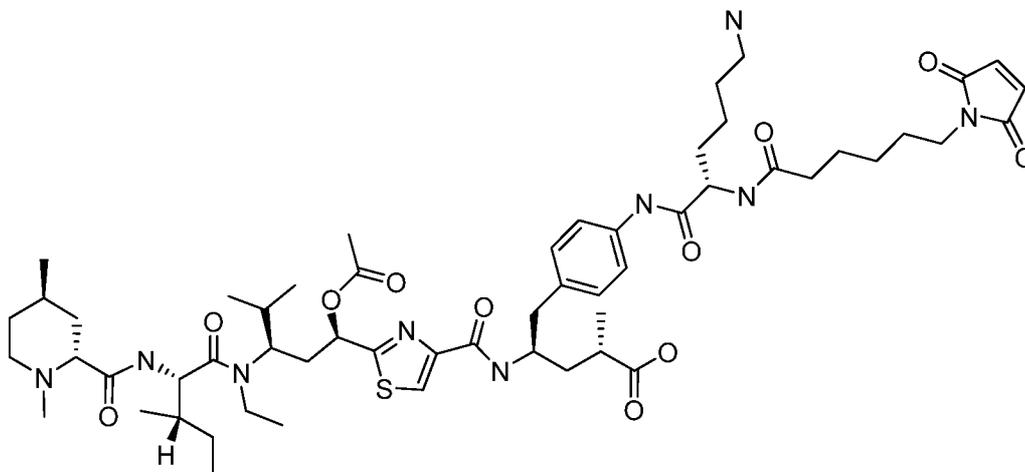
**[0222]** Хотя ингибиторы топоизомеразы I и являются предпочтительными, как указано выше, следует отметить, что с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению может быть связано любое подходящее средство (например, лекарственное средство/цитотоксин). Примеры других подходящих средств приведены ниже.

**[0223]** В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой тубулизин или производное тубулизина. В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой тубулизин А, характеризующийся следующей химической структурой:



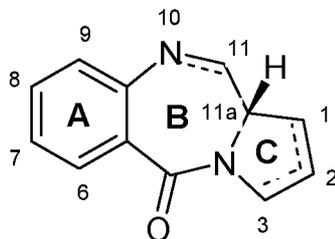
**[0224]** Тубулизины являются представителями класса природных веществ, выделенных из видов миксобактерий. Как средства, взаимодействующие с цитоскелетом, тубулизины являются митотическими ядами, которые подавляют полимеризацию тубулина и приводят к остановке клеточного цикла и апоптозу. Используемый в данном документе термин "тубулизин" относится как в целом, так и по отдельности к встречающимся в природе тубулизинам и аналогам и производным тубулизинов. Иллюстративные примеры тубулизинов раскрыты, например, в WO 2004005326A2, WO 2012019123A1, WO 2009134279A1, WO 2009055562A1, WO 2004005327A1, US7776841, US7754885, US20100240701, US7816377, US20110021568 и US20110263650, включенных в данный документ посредством ссылки. Следует понимать, что такие производные включают, например, пролекарства на основе тубулина или тубулизины, которые содержат одни или несколько видов защиты или защитных групп, один или несколько связывающих фрагментов.

**[0225]** В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой тубулизин 1508, также обозначаемый в данном документе "AZ1508" и описанный более подробно в WO 2015157594, включенном в данный документ посредством ссылки, при этом он характеризуется следующей структурой:



**[0226]** В другом варианте осуществления цитотоксин может представлять собой пирролобензодиазепин (PBD) или производное PBD. PBD перемещается в ядро, где он

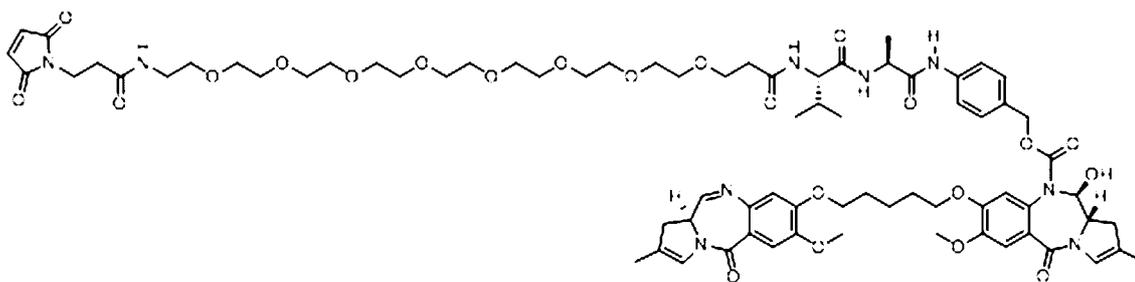
осуществляет поперечную сшивку ДНК, что предотвращает репликацию во время митоза, повреждая ДНК за счет индукции однонитевых разрывов и впоследствии приводя к апоптозу. Некоторые PBD способны распознавать специфические последовательности ДНК и связываться с ними; при этом предпочтительной последовательностью является PuGpu. PBD характеризуются следующей общей структурой:



**[0227]** PBD отличаются количеством, типом и положением заместителей как в их ароматических А-кольцах, так и в пиррольных С-кольцах, а также степенью насыщения С-кольца. В В-кольце присутствует либо имин ( $N=C$ ), либо карбиноламин ( $NH-CH(OH)$ ), либо метиловый эфир карбиноламина ( $NH-CH(OMe)$ ) в положении N10-C11, которое является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты характеризуются (S)-конфигурацией в хиральном положении C11a, которая обеспечивает им правовращение, если смотреть от С-кольца по направлению к А-кольцу. Это также придает им соответствующую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздой В-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию в сайте связывания. Их способность образовывать аддукт в малой борозде позволяет им препятствовать процессингу ДНК, следовательно они могут применяться в качестве противоопухолевых средств.

**[0228]** Первый противоопухолевый антибиотик на основе PBD, антрамицин, был открыт в 1965 году. С тех пор сообщалось о ряде встречающихся в природе PBD и было разработано более 10 путей синтеза множества аналогов. К представителям семейства относятся эббимицин, чикамицин, DC-81, мазетрамицин, неотрамицины А и В, поротрамицин, протракарцин, сибаномицин (DC-102), сибиромицин и томамицин. PBD и содержащие их ADC также описаны в WO 2015/155345 и WO 2015/157592, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0229]** В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой PBD 3249, также обозначаемый в данном документе "SG3249" и описанный более подробно в WO 2014/057074, включенном в данный документ посредством ссылки, при этом он характеризуется следующей структурой:

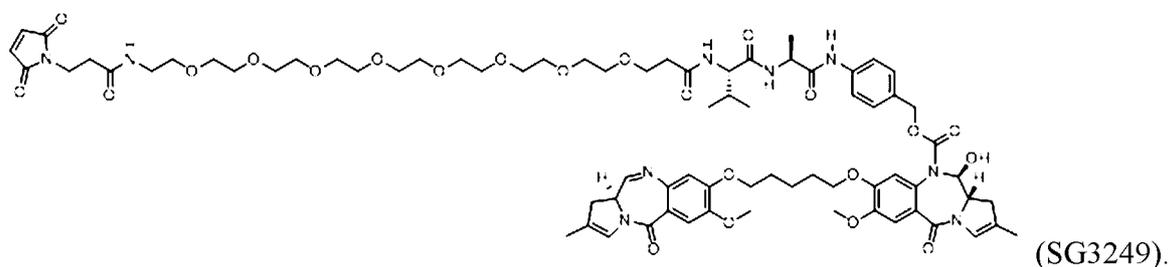


**[0230]** Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249.

**[0231]** Например, в одном аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4 (например, эпитопом полипептида В7-Н4), содержащие:

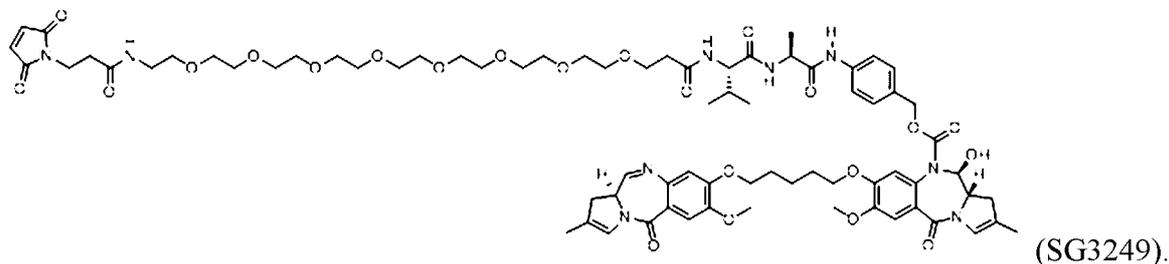
- i. HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или ее функциональный вариант;
- ii. HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее функциональный вариант;
- iii. HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или ее функциональный вариант;
- iv. LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или ее функциональный вариант;
- v. LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11 или ее функциональный вариант; и
- vi. LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249:

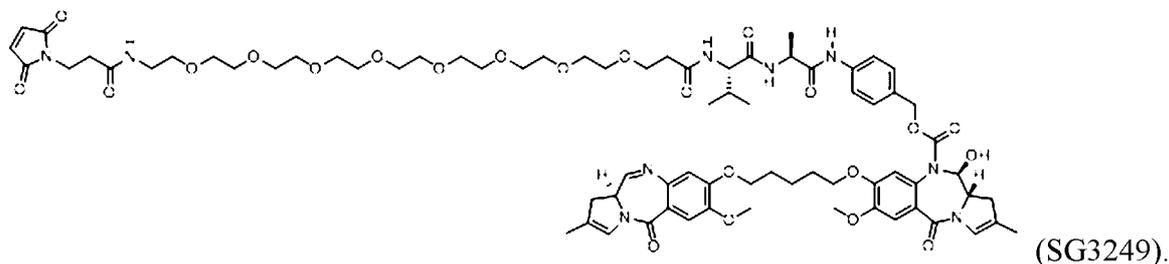


**[0232]** В другом аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4 (например, эпитопом полипептида В7-Н4), предусматривающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант; и вариабельную

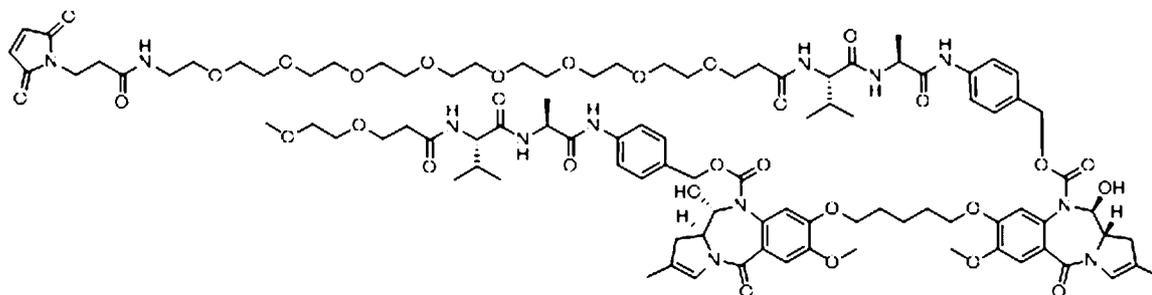
область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант; где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249:



**[0233]** В другом аспекте предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4 (например, эпитопом полипептида В7-Н4), предусматривающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или ее функциональный вариант; где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249:



**[0234]** В одном варианте осуществления цитотоксин представляет собой PBD 3315, также обозначаемый в данном документе "SG3315" и описанный более подробно в WO 2015/052322, включенном в данный документ посредством ссылки, при этом он характеризуется следующей структурой:



**[0235]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249, посредством остатка цистеина.

**[0236]** Антитело или его антигенный фрагмент по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с гетерологичными средствами (предпочтительно цитотоксином) с применением сайт-специфических способов конъюгации или способов конъюгации, отличных от сайт-специфических. В одном варианте осуществления антитела и их антигенный фрагмент содержат один, два, три, четыре или больше терапевтических фрагментов. В одном варианте осуществления все терапевтические фрагменты одинаковые.

**[0237]** Традиционные стратегии конъюгации антител или их антигенсвязывающих фрагментов основаны на случайной конъюгации полезной нагрузки с антителом или фрагментом по остаткам лизина или цистеина. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент случайным образом конъюгированы с гетерологичным средством (предпочтительно цитотоксином), например, посредством частичного восстановления антитела или фрагмента с последующей реакцией с требуемым средством с присоединением линкерного фрагмента или без него. Антитело или фрагмент можно восстановить с применением ДТТ или сходного восстановителя. Средство с присоединенным линкерным фрагментом или без него затем можно добавлять с молярным избытком к восстановленному антителу или фрагменту в присутствии DMSO. После конъюгации можно добавлять избыток свободного цистеина для гашения непрореагировавшего средства. Реакционную смесь затем можно очищать и осуществлять замену буфера на PBS.

**[0238]** В одном варианте осуществления средство (например, цитотоксин) конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством сайт-специфической конъюгации. В одном варианте осуществления сайт-специфическая конъюгация терапевтических фрагментов с антителами с применением реакционноспособных аминокислотных остатков в конкретных положениях приводит к получению гомогенных препаратов ADC с однородной стехиометрией.

**[0239]** Сайт-специфическая конъюгация может происходить по остатку цистеина или по не природной аминокислоте. В предпочтительном варианте осуществления гетерологичное средство (предпочтительно цитотоксин) конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством по меньшей мере одного остатка цистеина.

**[0240]** В одном варианте осуществления гетерологичное средство (предпочтительно цитотоксин) химически конъюгировано с боковой цепью аминокислоты (предпочтительно в конкретном положении по Kabat в Fc-области). В одном варианте осуществления средство (например, цитотоксическое или визуализирующее средство)

конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством замещения цистеина в по меньшей мере одном из положений 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В одном варианте осуществления конкретные положения по Kabat представляют собой 239, 442 или оба из них. В одном варианте осуществления конкретные положения представляют собой положение 442 по Kabat, аминокислотную вставку между положениями 239 и 240 по Kabat или оба из них. В одном варианте осуществления гетерологичное средство (предпочтительно цитотоксин) конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством тиол-малеимидной связи. В некоторых аспектах боковая цепь аминокислоты представляет собой сульфгидрильную боковую цепь.

**[0241]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь (например, предпочтительно содержащую VL и константную область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44, и тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249; предпочтительно где цитотоксин, представляющий собой пирролобензодиапезин SG3249, конъюгирован с остатком цистеина в положении аминокислоты 240 указанной тяжелой цепи.

**[0242]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь (например, предпочтительно содержащую VL и константную область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44, и тяжелую цепь (например, содержащую VH и константную область тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51; где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249.

**[0243]** Ссылка в данном документе на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с цитотоксином, синонимична с терминами "конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC)" или "ADC к B7-H4".

**[0244]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, ADC к B7-H4) обеспечивают доставку цитотоксической полезной нагрузки к клетке (предпочтительно B7-H4-экспрессирующей клетке) и ингибируют или подавляют пролиферацию (например, опухоли) на по меньшей мере 10%, или по меньшей

мере 20%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или приблизительно 100% (предпочтительно по меньшей мере 40%) относительно уровня ингибирования или подавления при отсутствии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, ADC к В7-Н4). Клеточную пролиферацию можно анализировать с применением известных из уровня техники методик, которые позволяют измерять скорость деления клеток и/или долю клеток в популяции клеток, проходящих клеточное деление, и/или скорость утраты клеток из популяции клеток в связи с терминальной дифференцировкой или гибелью клеток (например, включение тимидина).

**[0245]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенный фрагмент (например, ADC к В7-Н4) по настоящему изобретению связываются с В7-Н4 на поверхности клетки и поглощаются клеткой. В одном варианте осуществления антиген или соответствующий фрагмент антитела поглощаются клеткой (предпочтительно В7-Н4-экспрессирующей клеткой) с IC50 за 10 минут, составляющей приблизительно от 100 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 250 нг/мл, от приблизительно 250 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл, от приблизительно 350 нг/мл до приблизительно 450 нг/мл, от приблизительно 500 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл, от приблизительно 500 нг/мл до приблизительно 750 нг/мл, от приблизительно 750 нг/мл до приблизительно 850 нг/мл или от приблизительно 900 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл.

**[0246]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенный фрагмент (например, ADC к В7-Н4) поглощаются клеткой (предпочтительно В7-Н4-экспрессирующей клеткой) с IC50 за 30 минут, составляющей приблизительно от 100 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 250 нг/мл, от приблизительно 250 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл, от приблизительно 250 нг/мл до приблизительно 350 нг/мл, от приблизительно 350 нг/мл до приблизительно 450 нг/мл, от приблизительно 500 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл, от приблизительно 500 нг/мл до приблизительно 750 нг/мл, от приблизительно 750 нг/мл до приблизительно 850 нг/мл или от приблизительно 900 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл.

**[0247]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенный фрагмент (например, ADC к В7-Н4) поглощаются клеткой (предпочтительно В7-Н4-экспрессирующей клеткой) с IC50 за 120 минут, составляющей от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл, от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно

100 нг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 200 нг/мл, от приблизительно 200 нг/мл до приблизительно 300 нг/мл, от приблизительно 300 нг/мл до приблизительно 400 нг/мл или от приблизительно 400 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл.

**[0248]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенный фрагмент (например, ADC к В7-Н4) поглощаются клеткой (предпочтительно В7-Н4-экспрессирующей клеткой) с IC50 за 8 часов, составляющей от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 250 нг/мл, от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 25 нг/мл, от приблизительно 25 нг/мл до приблизительно 50 нг/мл, от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 100 нг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 150 нг/мл, от приблизительно 150 нг/мл до приблизительно 200 нг/мл или от приблизительно 200 нг/мл до приблизительно 250 нг/мл.

**[0249]** Во избежание неоднозначности толкования ссылка на "конъюгат" в данном документе означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с гетерологичным средством (предпочтительно цитотоксином), включая любое такое средство, описанное выше.

**[0250]** В дополнение к вариантам терапевтического применения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, описанных выше, "конъюгаты" по настоящему изобретению также можно применять в способе терапии. Таким образом, также предусмотрен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата формулы IV). Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество, достаточное для того, чтобы продемонстрировать пользу для пациента. Такая польза может представлять собой по меньшей мере снижение интенсивности по меньшей мере одного симптома. Реально вводимое количество, а также скорость и динамика введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например принятие решений о дозах, находится в пределах компетенции врачей общей практики и других врачей.

**[0251]** Конъюгат можно вводить отдельно или в комбинации с другими средствами для лечения либо одновременно, либо последовательно в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Примеры видов лечения и терапии включают без ограничения химиотерапию (введение активных средств, включая, например, лекарственные средства), хирургическое лечение и лучевую терапию.

**[0252]** Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и для применения по настоящему изобретению могут содержать, в дополнение к активному

ингредиенту, т. е. конъюгату/ADC по настоящему изобретению (например, формулы IV), фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, широко известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны противодействовать эффективности активного ингредиента. Конкретная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или может осуществляться посредством инъекции, например, внутривенной, подкожной или внутримышечной.

**[0253]** Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, продукты переработки нефти, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

**[0254]** Для внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или инъекции в очаг поражения активный ингредиент будет находиться в форме водного раствора, приемлемого для парентерального введения, который не содержит пирогенов и характеризуется подходящим значением pH, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники могут получить пригодные растворы с применением, например, изотонических сред-носителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор лактата Рингера для инъекций. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки могут быть включены при необходимости.

**[0255]** Предпочтительно, конъюгаты можно использовать для лечения пролиферативного заболевания. Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, как, например, неопластический или гиперпластический рост, будь то *in vitro* или *in vivo*. Термин "пролиферативное заболевание" в качестве альтернативы может называться "раком".

**[0256]** Подходящее пролиферативное заболевание (например, рак) предпочтительно будет характеризоваться присутствием раковых клеток, которые экспрессируют B7-H4.

**[0257]** Примеры пролиферативных состояний включают без ограничения клеточную пролиферацию доброкачественного, предракового и злокачественного

характера, в том числе без ограничения новообразования и опухоли (например, гистиоцитому, глиому, астроцитому, остеому), виды рака (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, карциному молочной железы, карциному яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), виды лейкоза, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например соединительных тканей) и атеросклероз. Другие виды рака, представляющие интерес, включают без ограничения злокачественные состояния системы крови, такие как виды лейкоза и лимфомы, например, неходжкинскую лимфому и ее подтипы, такие как DLBCL, лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфома из клеток мантийной зоны и фолликулярная лимфома, лимфому Ходжкина, AML и другие виды рака В- или Т-клеточного происхождения. Любой тип клеток может подвергаться лечению, в том числе без ограничения клетки легкого, желудочно-кишечного тракта (в том числе, например, кишечника, толстой кишки), молочной железы (маммарные), яичника, предстательной железы, печени (печеночные), почки (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, головного мозга и кожи.

**[0258]** Конъюгат антитела и лекарственного средства может быть меченым, например, для способствования выявлению связывания с клеткой (*in vitro* или *in vivo*). Метка может представлять собой биотиновую метку. В другом варианте осуществления метка может представлять собой радиоактивный изотоп.

**[0259]** В другом аспекте предусмотрен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

**[0260]** В одном варианте осуществления полинуклеотид может представлять собой выделенный полинуклеотид.

**[0261]** Последовательность(последовательности) (например, полинуклеотидная(полинуклеотидные) последовательность(последовательности)) по настоящему изобретению включают последовательности, которые были извлечены из среды, в которой они встречаются в природных условиях, рекомбинантные или клонированные (например, ДНК) изоляты и химически синтезированные аналоги или аналоги, синтезированные гетерологичными системами биологическим путем.

**[0262]** Последовательность(последовательности) (например, полинуклеотидная(полинуклеотидные) последовательность(последовательности)) по настоящему изобретению можно получать любыми способами, известный из уровня

техники. Например, последовательность(последовательности) в больших количествах можно получать путем обеспечения репликации и/или экспрессии в подходящей клетке-хозяине. Природные или синтетические ДНК-фрагменты, кодирующие требуемый фрагмент, как правило, будут включены в рекомбинантные конструкции нуклеиновой кислоты, как правило ДНК-конструкции, которые возможно вводить в прокариотическую или эукариотическую клетку и обеспечивать их репликацию в них. Обычно ДНК-конструкции будут подходить для автономной репликации в одноклеточном хозяине, таком как дрожжи или бактерии, но также могут быть предназначены для введения в геном культивируемых линий клеток бактерий, насекомых, млекопитающих, растений или других эукариотов и интеграции в них.

**[0263]** Последовательность(последовательности) (например, полинуклеотидная(полинуклеотидные) последовательность(последовательности)) по настоящему изобретению также можно получать путем химического синтеза, например, полинуклеотид – с помощью фосфорамидитного способа или триэфирного способа, и их можно осуществлять с использованием коммерческих автоматизированных устройств для синтеза олигонуклеотидов. Двухнитевой фрагмент (например, ДНК) можно получать из однонитевого продукта химического синтеза либо путем синтезирования комплементарной нити и отжига нитей вместе в подходящих условиях, либо путем добавления комплементарной нити с применением ДНК-полимеразы с подходящей последовательностью праймера.

**[0264]** В случае применения в отношении последовательности (например, полинуклеотидной последовательности) по настоящему изобретению термин "выделенный" предпочтительно обозначает, что последовательность была извлечена из ее природного генетического окружения и, таким образом, не содержит других посторонних или нежелательных кодирующих последовательностей (но может включать встречающиеся в природе 5'- и 3'-нетранслируемые области, такие как промоторы и терминаторы) и находится в форме, подходящей для применения в генетически сконструированных системах для продуцирования белка. Такие выделенные молекулы являются таковыми, которые отделены от их природной среды.

**[0265]** В другом аспекте в данном документе предусмотрена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, при этом указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

**[0266]** В одном варианте осуществления полинуклеотид кодирует VH-цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления

полинуклеотид по настоящему изобретению может кодировать VL-цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления полинуклеотид может кодировать VH- и VL-цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления полинуклеотид может дополнительно кодировать лидерную последовательность (например, которая функционирует в качестве секреторной последовательности для регуляции транспорта полипептида из клетки).

**[0267]** В другом аспекте предусмотрен вектор (например, плаزمид), содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению.

**[0268]** Варианты описанного выше полинуклеотида охватываются настоящим изобретением. Варианты полинуклеотидов могут предусматривать наличие изменений в кодирующих областях, некодирующих областях или как в тех, так и в других. В одном варианте осуществления вариант полинуклеотида предусматривает наличие изменения, которое обеспечивает получение "молчащих" замен, добавлений или делеций, но не приводит к изменению свойств или видов активности кодируемого полипептида. В одном варианте осуществления вариант полинуклеотида получен в результате "молчащей" замены, обусловленной вырожденностью генетического кода. Вариант полинуклеотида может быть получен по ряду причин, например, для оптимизации экспрессии кодона для конкретного хозяина (изменение кодонов в мРНК человека на предпочтительные для бактериального хозяина, такого как *E. coli*). Также предусмотрены векторы и клетки, содержащие указанный вариант полинуклеотида.

**[0269]** Настоящее изобретение охватывает способы получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с полипептидом В7-Н4 (например, эпитопом полипептида В7-Н4), включающие обеспечение экспрессии полинуклеотида в клетке-хозяине, при этом указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

**[0270]** Настоящее изобретение дополнительно охватывает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, получаемые посредством указанных способов для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с полипептидом В7-Н4 (например, эпитопом полипептида В7-Н4).

**[0271]** В предпочтительном варианте осуществления способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включает (а) культивирование клетки-хозяина и (b) выделение экспрессированных антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки.

**[0272]** Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению включают клетки прокариотов, дрожжей, насекомых или высших эукариотов (предпочтительно, где полинуклеотид находится под контролем подходящих промоторов). Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или палочковидные бактерии. Клетки высших эукариотов предусматривают стабильные линии клеток, происходящие от млекопитающих, описанные в данном документе. Можно также использовать бесклеточные системы трансляции.

**[0273]** В одном аспекте предусмотрен набор, содержащий антиген или связывающий фрагмент антитела, описанные в данном документе. Дополнительно охватывается применение указанного набора в способах по настоящему изобретению.

**[0274]** В одном варианте осуществления набор содержит выделенный (например, очищенный) антиген или связывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления набор содержит выделенный (например, очищенный) антиген или связывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению, где антиген или связывающий фрагмент антитела содержат средство (например, конъюгированный цитотоксин), описанное в данном документе. В одном варианте осуществления набор содержит один или несколько контейнеров. В наборе могут предоставляться антиген или связывающий фрагмент антитела и средство по отдельности (например, средство не конъюгировано с антигеном или связывающим фрагментом антитела, но находится в форме, подходящей для конъюгации с ним); необязательно где в наборе дополнительно предоставлены инструкции и/или реагенты для конъюгирования средства с антигеном или связывающим фрагментом антитела. В одном варианте осуществления набор содержит все компоненты, необходимые и/или достаточные для проведения анализа для выявления, в том числе все контрольные образцы, указания для проведения анализов и любое необходимое программное обеспечение для анализа и представления результатов.

**[0275]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно применять в анализах иммуноспецифического связывания посредством любого способа, известного из уровня техники. Иммунологические анализы, которые можно применять, включают без ограничения системы конкурентного и неконкурентного анализа с использованием таких методик, как вестерн-блот, радиоиммунологические анализы (RIA), ELISA, ELISPOT, иммунологические "сэндвич"-анализы, анализы иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции диффузионной преципитации в геле, анализы иммунодиффузии, анализы агглютинации, анализы

фиксации комплемента, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммунологические анализы и иммунологические анализы с белком А.

**[0276]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно применять в гистологических исследованиях, например в иммунофлуоресцентной, иммуноэлектронной микроскопии, или анализах, отличных от иммунологических, например, для выявления В7-Н4 или его консервативных вариантов или пептидных фрагментов *in situ*. Выявление *in situ* можно осуществлять путем забора гистологического образца у пациента и применения в отношении него меченого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, например, с применением путем нанесения покрывающего слоя меченого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента на биологический образец. Благодаря применению такой процедуры можно определить не только присутствие В7-Н4 или его консервативных вариантов или пептидных фрагментов, но также их распределение в исследуемой ткани. Используя настоящее изобретение, специалисты средней квалификации в данной области техники без труда поймут, что любой из широкого спектра гистологических способов (таких как процедуры окрашивания) можно модифицировать для того, чтобы добиться такого выявления *in situ*.

#### Антитела

**[0277]** Термин "антитело" распространяется на моноклональные антитела и их фрагменты (например, проявляющие требуемую биологическую активность). В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. В более предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело. В одном варианте осуществления в способах по настоящему изобретению могут использоваться поликлональные антитела.

**[0278]** В частности, антитело представляет собой белок, содержащий по меньшей мере одну или две переменные области тяжелой (H) цепи (сокращенные в данном документе как VHC), и по меньшей мере одну или две переменные области легкой (L) цепи (сокращенные в данном документе как VLC). Области VHC и VLC можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые термином "определяющие комплементарность области" ("CDR"), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми термином "каркасные области" (FR). Границы каркасных областей и CDR были точно определены (см. Kabat, E.A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991 и Chothia, C. et al, J. Mol. Biol. 196:901-917,

1987). Предпочтительно каждая VHC и VLC состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDRI, FR2, DR2, FR3, CDR3, FR4. VHC- или VLC-цепи антитела могут дополнительно содержать всю или часть константной области тяжелой или легкой цепей. В одном варианте осуществления антитело представляет собой тетрамер из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина, где тяжелая и легкая цепи иммуноглобулина взаимно соединены, например, дисульфидными связями. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Варибельная область тяжелой и легкой цепей содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Термин "антитело" включает интактные иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипов), где легкие цепи иммуноглобулина могут принадлежать к типам каппа или лямбда. Термин антитело, используемый в данном документе, также относится к части антитела, которая связывается с одним из вышеуказанных маркеров, например молекуле, в которой одна или несколько цепей иммуноглобулина не являются полноразмерными, но которая связывается с маркером. Примеры связывающих частей, охватываемых термином антитело, включают: (i) Fab-фрагмент – одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VLC, VHC, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент – двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fc-фрагмент, состоящий из доменов VHC и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VLC и VHC одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VHC; и (vi) выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), содержащая достаточную часть каркаса для связывания, например антигенсвязывающая часть варибельной области. Антигенсвязывающая часть варибельной области легкой цепи и антигенсвязывающая часть варибельной области тяжелой цепи, например два домена Fv-фрагмента, VLC и VHC, можно соединить с применением рекомбинантных способов посредством синтетического линкера, который позволяет получить их в виде единой белковой цепи, в которой области VLC и VHC соединяются попарно с образованием одновалентной молекулы (известной как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 1A1-ATi-A1β; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охвачены термином антитело. Их можно получать с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и части проверяют на применимость таким же образом, как и интактные антитела.

**[0279]** В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одно или несколько, выбранные из антитела мыши, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, полиспецифического антитела, или их комбинацию.

**[0280]** В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один или несколько, выбранные из Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fab-фрагмента, dsFv-фрагмента, scFv-фрагмент, sc(Fv)<sub>2</sub>-фрагмента, или их комбинацию.

**[0281]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело (mAb).

**[0282]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, mAb) по настоящему изобретению представляют собой scFV.

**[0283]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с молекулами B7-H4 разных видов, например, антитело или фрагмент могут связываться с B7-H4 мыши, B7-H4 крысы, кролика, B7-H4 человека и/или B7-H4 яванского макака. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент могут связываться с B7-H4 человека и B7-H4 яванского макака. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент также могут связываться с B7-H4 мыши.

**[0284]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфически связываться с B7-H4, например B7-H4 человека и B7-H4 яванского макака, но специфически не связываются с B7-H1, B7-H2 и/или B7-H3 человека.

**[0285]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать, в дополнение к VH и VL, константную область тяжелой цепи или ее фрагмент. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи человека, например константную область IgG человека, например константную область IgG1 человека. В одном варианте осуществления (предпочтительно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством, таким как цитотоксическое средство) между аминокислотами S239 и V240 в области CH<sub>2</sub> IgG1 вставлен остаток цистеина. Этот цистеин обозначается как "239-вставка" или "239i".

**[0286]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать константную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

**[0287]** В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи или ее фрагмент, например константная область IgG человека или ее фрагмент, может предусматривать наличие одной или нескольких аминокислотных замен по сравнению с константным доменом IgG дикого типа, где модифицированный IgG характеризуется повышенным периодом полужизни по сравнению с периодом полужизни IgG, содержащего константный домен IgG дикого типа. Например, константный домен IgG может предусматривать наличие одной или нескольких аминокислотных замен по аминокислотным остаткам в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, где нумерация положений аминокислот приведена согласно EU-индексу, как изложено у Kabat. В одном варианте осуществления константный домен IgG может предусматривать наличие одной или нескольких из замены аминокислоты в положении 252 по Kabat на тирозин (Y), фенилаланин (F), триптофан (W) или треонин (T), замены аминокислоты в положении 254 по Kabat на треонин (T), замены аминокислоты в положении 256 по Kabat на серин (S), аргинин (R), глутамин (Q), глутаминовую кислоту (E), аспарагиновую кислоту (D) или треонин (T), замены аминокислоты в положении 257 по Kabat на лейцин (L), замены аминокислоты в положении 309 по Kabat на пролин (P), замены аминокислоты в положении 311 по Kabat на серин (S), замены аминокислоты в положении 428 по Kabat на треонин (T), лейцин (L), фенилаланин (F) или серин (S), замены аминокислоты в положении 433 по Kabat на аргинин (R), серин (S), изолейцин (I), пролин (P) или глутамин (Q) или замены аминокислоты в положении 434 по Kabat на триптофан (W), метионин (M), серин (S), гистидин (H), фенилаланин (F) или тирозин. В предпочтительном варианте осуществления константный домен IgG может предусматривать наличие аминокислотных замен по сравнению с константным доменом IgG человека дикого типа, в том числе в виде замены аминокислоты в положении 252 по Kabat на тирозин (Y), замены аминокислоты в положении 254 по Kabat на треонин (T) и замены аминокислоты в положении 256 по Kabat на глутаминовую кислоту (E). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, где тяжелая цепь представляет собой мутантный вариант YTE IgG1 человека.

**[0288]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать, в дополнение к VH и VL и необязательно константной области тяжелой цепи или ее фрагменту, константную область легкой цепи или ее фрагмент. В одном варианте осуществления константная область легкой цепи представляет собой

константную область каппа/лямбда легкой цепи, например константную область каппа человека или константную область лямбда человека.

**[0289]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

**[0290]** В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность VH и/или VL может характеризоваться 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходством с последовательностью, приведенной в данном документе. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность VH и/или VL может предусматривать наличие 1, 2, 3, 4, 5 или больше замен, например консервативных замен, по сравнению с последовательностью, приведенной в данном документе. Антитело к B7-H4, содержащее VH- и VL-области, характеризующиеся определенным процентом сходства с VH-областью или VL-областью, или предусматривающие наличие одной или нескольких замен, например консервативных замен, может быть получено с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих VH- и/или VL-области, описанные в данном документе, с последующим испытанием кодируемого измененного антитела в отношении связывания с B7-H4 и необязательно испытанием в отношении сохранения функции с применением функциональных анализов, описанных в данном документе.

**[0291]** Аффинность или авидность антитела или его антигенсвязывающий фрагмента в отношении антигена можно определять экспериментально с применением любого подходящего способа, широко известного из уровня техники, например проточной цитометрии, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), или радиоиммуноанализа (RIA), или кинетических анализов (например, анализа KINEXA® или BIACORE™). С легкостью можно применять анализы в формате прямого связывания, а также анализы в формате конкурентного связывания. (См., например, Berzofsky et al., *Antibody-Antigen Interactions*, In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992) и описанные в данном документе способы.) Измеряемая аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьироваться при измерении в различных условиях (например, концентрация солей, pH, температура). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания антигена (например, KD или Kd, Kon, Koff) проводят с использованием стандартизированных растворов антитела и антигена и стандартизированного буфера, как известно из уровня техники.

**[0292]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с В7-Н4-экспрессирующими клетками с IC50 ниже чем приблизительно 500 нМ, ниже чем приблизительно 350 нМ, ниже чем приблизительно 250 нМ, ниже чем приблизительно 150 нМ, ниже чем приблизительно 100 нМ, ниже чем приблизительно 75 нМ, ниже чем приблизительно 60 нМ, ниже чем приблизительно 50 нМ, ниже чем приблизительно 40 нМ, ниже чем приблизительно 30 нМ, ниже чем приблизительно 20 нМ, ниже чем приблизительно 15 нМ, ниже чем приблизительно 10 нМ, ниже чем приблизительно 5 нМ, ниже чем приблизительно 1 нМ, ниже чем приблизительно 500 пМ, ниже чем приблизительно 350 пМ, ниже чем приблизительно 250 пМ, ниже чем приблизительно 150 пМ, ниже чем приблизительно 100 пМ, ниже чем приблизительно 75 пМ, ниже чем приблизительно 60 пМ, ниже чем приблизительно 50 пМ, ниже чем приблизительно 40 пМ, ниже чем приблизительно 30 пМ, ниже чем приблизительно 20 пМ, ниже чем приблизительно 15 пМ, ниже чем приблизительно 10 пМ или ниже чем приблизительно 5 пМ. Предпочтительно указанное значение IC50 измерено с помощью проточной цитометрии.

**[0293]** "Моноклональное антитело" (mAb) относится к гомогенной популяции антител, вовлеченных в высокоспецифичное распознавание и связывание одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное антитело" охватывает как интактные, так и полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные (scFv) мутантные варианты, слитые белки, содержащие часть, представляющую собой антитело, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена. Кроме того, "моноклональное антитело" относится к таким антителам, полученным любым из ряда способов, в том числе без ограничения с помощью гибридомы, отбора с использованием фагового дисплея, рекомбинантной экспрессии и трансгенных животных.

**[0294]** В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, mAb) по настоящему изобретению представляют собой гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Соответственно, указанное гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой IgG.

**[0295]** Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, полученному из иммуноглобулина, отличного от человеческого (например, мышинового), которое было

сконструировано с обеспечением содержания в нем минимального количества последовательностей, отличных от человеческих (например, мышинных).

Гуманизированные антитела обычно представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки области, определяющей комплементарность (CDR), заменены остатками CDR от видов, отличных от человека (например, мыши, крысы, кролика или хомяка), которые характеризуются требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью (Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536). В некоторых случаях остатки каркасной области (FW) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, присутствующими в антителе из видов, отличных от человека, которое характеризуется требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью.

**[0296]** Гуманизированные антитела можно дополнительно модифицировать посредством замены дополнительных остатков либо в каркасной области Fv и/либо в пределах заменяемых остатков, отличных от человеческих, для усовершенствования и оптимизации специфичности, аффинности и/или функциональной способности антитела. Как правило, гуманизированные антитела будут содержать практически все из по меньшей мере одного и обычно двух или трех переменных доменов, содержащих все или практически все из CDR-областей, которые соответствуют таковым в иммуноглобулине, отличном от человеческого, тогда как все или практически все из FR-областей являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патентах США №№ 5225539 или 5639641.

**[0297]** "Переменная область" антитела относится к переменной области легкой цепи антитела или переменной области тяжелой цепи антитела либо по отдельности, либо в комбинации. Каждая из переменных областей тяжелой и легкой цепей состоит из четырех каркасных областей (FW), соединенных тремя областями, определяющими комплементарность (CDR), также известными как гиперпеременные области. В каждой цепи CDR удерживаются в непосредственной близости друг к другу с помощью FW-областей и вместе с CDR из другой цепи участвуют в образовании антигенсвязывающего участка антител. Существует по меньшей мере две методики определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой изменчивости последовательностей (т. е. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health,

Bethesda Md.)); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani et al. (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Кроме того, для определения CDR в данной области техники иногда применяют комбинации этих двух подходов.

**[0298]** Обычно при обозначении остатка в вариабельном домене (примерно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) применяют "систему нумерации по Kabat" (например, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

**[0299]** Нумерация положений аминокислот согласно Kabat относится к системе нумерации, применяемой к вариабельным доменам тяжелой цепи или вариабельным доменам легкой цепи антител в соответствии с собранными сведениями в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При применении данной системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FW или CDR вариабельного домена или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать вставку из одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. согласно Kabat) после остатка 82 FW тяжелой цепи.

**[0300]** Нумерацию остатков по Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Kabat, в областях гомологии. В отличие от этого Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в соответствии со схемой нумерации по Kabat вставки расположены в H35A и H35B; при этом если не присутствуют ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, то петля заканчивается на 34). Определение гипервариабельных областей по AbM представляет собой компромисс между определением CDR по Kabat и структурных петель по Chothia и применяется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. В таблице ниже перечислены положения аминокислот, составляющих вариабельные области антител в каждой системе.

Область	Kabat	AbM	Chothia
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1 <sup>1</sup>	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
HCDR1 <sup>2</sup>	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

<sup>1</sup>Нумерация по Kabat

<sup>2</sup>Нумерация по Chothia

**[0301]** ImMunoGeneTics (IMGT) также представляет систему нумерации для переменных областей иммуноглобулинов, в том числе CDR. См., например, Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003). Система нумерации IMGT основана на выравнивании более 5000 последовательностей, данных о структуре и определении характеристик гиперпеременных петель, и она обеспечивает возможность легкого сравнения переменных и CDR-областей для всех видов. В соответствии со схемой нумерации IMGT VH-CDR1 находится в положениях 26-35, VH-CDR2 находится в положениях 51-57, VH-CDR3 находится в положениях 93-102, VL-CDR1 находится в положениях 27-32, VL-CDR2 находится в положениях 50-52, и VL-CDR3 находится в положениях 89-97.

**[0302]** Описанные последовательности VH CDR, используемые по ходу настоящего описания, соответствуют местоположениям согласно классической нумерации по Kabat, а именно VH-CDR1 по Kabat находится в положениях 31-35, VH-CDR2 находится в положениях 50-65, и VH-CDR3 находится в положениях 95-102. VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 также соответствуют местоположениям согласно классической нумерации по Kabat, а именно положениям 24-34, 50-56 и 89-97 соответственно.

**[0303]** В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело человека.

**[0304]** Термин "антитело человека" означает антитело, вырабатываемое в организме человека, или антитело, характеризующееся аминокислотной последовательностью, соответствующей антителу, вырабатываемому в организме человека, полученное с применением любой методики, известной из уровня техники. Это определение антитела человека включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или

легкой цепей человека, как, например, антитело, содержащее полипептиды легкой цепи мыши и тяжелой цепи человека.

**[0305]** В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой химерное антитело.

**[0306]** Термин "химерные антитела" относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит от двух или более видов. Вариабельная область как легкой, так и тяжелой цепи, как правило, соответствует вариабельной области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), с требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью, тогда как константные области гомологичны последовательностям в антителах, происходящих от другого вида (обычно человека), во избежание вызывания иммунного ответа у этого вида.

**[0307]** Термины "YTE" или "мутантный вариант YTE" относятся к мутации в Fc IgG1, которая приводит к усилению связывания с FcRn человека и улучшению в отношении периода полужизни антитела с указанной мутацией в сыворотке крови. Мутантный вариант YTE предусматривает наличие комбинации трех мутаций M252Y/S254T/T256E (EU-нумерация по Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), введенных в тяжелую цепь IgG1. См. патент США № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки. Было показано, что мутация YTE увеличивает период полужизни антител в сыворотке крови примерно в четыре раза по сравнению с таковым для того же антитела дикого типа (Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006); Robbie et al., (2013) Antimicrob. Agents Chemother. 57, 6147-6153). Также см. патент США № 7083784, который включен в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте.

**[0308]** "Аффинность связывания" в целом относится к силе совокупности нековалентных взаимодействий между одним связывающим участком молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, то при использовании в данном документе "аффинность связывания" относится к внутренне присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом может быть представлена константой диссоциации (KD). Аффинность можно измерить с помощью способов, общеизвестных из уровня техники, в том числе описанных в данном документе. Антитела с низкой аффинностью, как правило, связывают антиген медленно и склонны легко

диссоциировать, тогда как антитела с высокой аффинностью, как правило, связываются с антигеном быстрее и склонны дольше оставаться связанными. Из уровня техники известен ряд способов измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять для целей настоящего изобретения.

**[0309]** Эффективность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента обычно выражают в виде значения IC50 в нг/мл, если не указано иное. IC50 представляет собой медианную ингибирующую концентрацию молекулы антитела. В функциональных анализах IC50 представляет собой концентрацию, которая снижает биологический ответ на 50% от его максимума. В исследованиях связывания с лигандом IC50 представляет собой концентрацию, которая снижает уровень связывания рецептора на 50% от максимального уровня специфического связывания. IC50 можно рассчитать любым из ряда способов, известных из уровня техники.

**[0310]** Кратность улучшения эффективности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению по сравнению с эталонным антителом может быть по меньшей мере приблизительно 2-кратной, по меньшей мере приблизительно 4-кратной, по меньшей мере приблизительно 6-кратной, по меньшей мере приблизительно 8-кратной, по меньшей мере приблизительно 10-кратной, по меньшей мере приблизительно 20-кратной, по меньшей мере приблизительно 30-кратной, по меньшей мере приблизительно 40-кратной, по меньшей мере приблизительно 50-кратной, по меньшей мере приблизительно 60-кратной, по меньшей мере приблизительно 70-кратной, по меньшей мере приблизительно 80-кратной, по меньшей мере приблизительно 90-кратной, по меньшей мере приблизительно 100-кратной, по меньшей мере приблизительно 110-кратной, по меньшей мере приблизительно 120-кратной, по меньшей мере приблизительно 130-кратной, по меньшей мере приблизительно 140-кратной, по меньшей мере приблизительно 150-кратной, по меньшей мере приблизительно 160-кратной, по меньшей мере приблизительно 170-кратной или по меньшей мере приблизительно 180-кратной или больше.

**[0311]** Эффективность связывания антитела обычно выражают в виде значения EC50 в нМ или пМ, если не указано иное. EC50 – это концентрация лекарственного средства, которая индуцирует ответ, соответствующий медиане между ответом на исходном уровне и максимальным ответом после определенного времени воздействия. EC50 можно рассчитать любым из ряда способов, известных из уровня техники.

#### Получение антител

**[0312]** Антитела по настоящему изобретению можно получать с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и их

применимость подтверждена традиционными исследованиями связывания – иллюстративный способ описан в примере 2. Например, простой анализ связывания заключается в инкубации клетки, экспрессирующей антиген, с антителом. Если антитело помечено флуорофором, связывание антитела с антигеном можно выявить посредством FACS-анализа.

**[0313]** Можно обеспечивать выработку антител по настоящему изобретению у различных животных, в том числе мышей, крыс, кроликов, коз, овец, обезьян или лошадей. Можно обеспечивать выработку антител после иммунизации отдельными капсульными полисахаридами или множеством капсульных полисахаридов. Кровь, выделенная из организма таких животных, содержит поликлональные антитела – различные антитела, которые связываются с одним и тем же антигеном. Антигены также можно вводить курам для получения поликлональных антител в яичном желтке. Для получения моноклонального антитела, которое является специфическим в отношении одного эпитопа антигена, выделяют секретирующие антитела лимфоциты из организма животного и обеспечивают их иммортализацию посредством их слияния с линией раковых клеток. Слитые клетки называются гибридами, и они будут постоянно расти и секретировать антитело в культуре. Отдельные клетки гибридомы выделяют посредством клонирования с разбавлением для получения клонов клеток, все из которых продуцируют одно и то же антитело; эти антитела называются моноклональными антителами. Способы получения моноклональных антител являются традиционными методиками, известными специалистам в данной области техники (см., например, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*. GC Howard. CRC Books. 2006. ISBN 0849335280). Поликлональные и моноклональные антитела часто очищают посредством аффинной хроматографии с применением белка A/G или антигена.

**[0314]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно получать в виде моноклонального антитела к B7-H4, которое можно получать с применением гибридных способов, таких как способы, описанные в Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975). При применении гибридного способа мышью, хомяком или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют, как описано выше, чтобы вызвать продуцирование лимфоцитами антител, которые будут специфически связываться с иммунизирующим антигеном. Лимфоциты также можно иммунизировать *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют и обеспечивают их слияние с подходящей линией клеток миеломы, например, с применением полиэтиленгликоля с образованием клеток гибридомы, которые затем можно выборочно отделять от неслитых лимфоцитов и клеток миеломы. Гибридомы, которые продуцируют моноклональные антитела, специфически

направленные против выбранного антигена, как определено посредством иммунопреципитации, иммуноблоттинга или анализа связывания *in vitro*, например радиоиммуноанализа (RIA) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), затем можно размножить либо в культуре *in vitro* с применением стандартных способов (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986), либо *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных. Затем моноклональные антитела можно очищать из культуральной среды или асцитной жидкости с применением известных способов.

**[0315]** В качестве альтернативы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например в виде моноклональных антител) также можно получать с применением способов на основе рекомбинантной ДНК, как описано в патенте США № 4816567. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяют из зрелых В-клеток или клетки гибридомы, например посредством RT-PCR с применением олигонуклеотидных праймеров, которые позволяют специфически амплифицировать гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела, и их последовательность определяют с применением традиционных процедур. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи, затем клонируют в подходящие векторы экспрессии, которые при трансфекции ими клеток-хозяев, таких как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в других случаях не продуцируют белок иммуноглобулина, обеспечивают выработку моноклональных антител клетками-хозяевами. Также рекомбинантные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты требуемых видов можно выделять из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих CDR требуемых видов, как описано в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

**[0316]** Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий(кодирующие) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, можно дополнительно модифицировать посредством ряда различных способов с применением технологии рекомбинантных ДНК для получения альтернативных антител. В некоторых вариантах осуществления константные домены легкой и тяжелой цепей, например, моноклонального антитела мыши можно заменять (1) на такие области, например, антитела человека с получением химерного антитела или (2) на отличный от иммуноглобулина полипептид с получением слитого антитела. В некоторых вариантах осуществления константные области подвергаются усечению или удалению с получением требуемого фрагмента антитела из моноклонального антитела. Для оптимизации специфичности, аффинности и

т. п. моноклонального антитела можно использовать сайт-направленный мутагенез или мутагенез высокой плотности в отношении варибельной области.

**[0317]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела человека можно получать непосредственно с применением различных методик, известных из уровня техники. Можно получать иммортализованные В-лимфоциты человека, иммунизированные *in vitro* или выделенные из организма иммунизированного индивидуума, у которого вырабатывается антитело, направленное против антигена-мишени. См., например, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); патент США № 5750373.

**[0318]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно отбирать из фаговой библиотеки, где в такой фаговой библиотеке экспрессируются антитела человека, как описано, например, в Vaughan et al., *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996); Sheets et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991), и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991). Методики получения и применения фаговых библиотек антител также описаны в патентах США №№ 5969108, 6172197, 5885793, 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484 и 7264963, а также в Rothe et al., *J. Molec. Biol.*, 376:1182-1200 (2008), каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0319]** Стратегии обеспечения созревания аффинности и стратегии обеспечения перестановки цепей известны из уровня техники и могут применяться для получения высокоаффинных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов. См. работу Marks et al., *BioTechnology* 10:779-783 (1992), включенную посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0320]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, моноклональное антитело) могут представлять собой гуманизованное антитело. Можно также использовать способы конструирования, гуманизации или изменения поверхности отличных от человеческих или человеческих антител, и они широко известны из уровня техники. Гуманизованное, имеющее измененную поверхность или сходным образом сконструированное антитело может содержать один или несколько аминокислотных остатков из источника, отличного от человека, например без ограничения мыши, крысы, кролика, примата, отличного от человека, или другого млекопитающего. Эти аминокислотные остатки, отличные от человеческих, заменяются остатками, часто называемыми "импортируемыми" остатками,

которые обычно взяты из "импортируемого" переменного, константного или другого домена известной человеческой последовательности. Такие импортируемые последовательности можно использовать для снижения иммуногенности или снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, периода полужизни или любых других подходящих характеристик, известных из уровня техники. Соответствующим образом остатки CDR могут быть непосредственно и в наиболее существенной степени вовлечены в оказание влияния на связывание В7-Н4. Соответственно, часть отличных от человеческих или человеческих последовательностей CDR или все они предпочтительно сохраняются, тогда как последовательности переменных и константных областей, отличные от человеческих, могут быть заменены человеческими или другими аминокислотами.

**[0321]** Также антитела необязательно можно гуманизировать, изменять их поверхность, конструировать, или антитела человека можно конструировать с сохранением высокой аффинности к антигену В7-Н4 и других предпочтительных биологических свойств. Для достижения данной цели гуманизированные (или человеческие) или сконструированные антитела к В7-Н4 и антитела с измененной поверхностью можно получать необязательно посредством способа на основе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных и сконструированных продуктов с применением трехмерных моделей исходных, сконструированных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, в которых иллюстрируются и отображаются возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Рассмотрение этих изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, т. е. проанализировать остатки, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген, такой как В7-Н4. Таким образом, остатки FW можно выбирать из консенсусной и импортированной последовательностей и комбинировать их таким образом, чтобы обеспечить требуемые характеристики антитела, такие как повышенная аффинность в отношении антигена-мишени (антигенов-мишеней).

**[0322]** Гуманизацию, изменение поверхности или конструирование антител к В7-Н4 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению можно выполнять с применением любого известного способа, такого как без ограничения

способы, описанные в Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993); патентах США №№ 5639641, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, 7557189, 7538195 и 7342110; международных заявках №№ PCT/US98/16280, PCT/US96/18978, PCT/US91/09630, PCT/US91/05939, PCT/US94/01234, PCT/GB89/01334, PCT/GB91/01134, PCT/GB92/01755, публикациях международных патентных заявок №№ WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430 и публикации европейской патентной заявки № EP 229246, каждая из которых во всей своей полноте включена в данный документ посредством ссылки, включая упоминаемые в них литературные источники.

**[0323]** Гуманизированные антитела к В7-Н4 и их антигенсвязывающие фрагменты также можно получать в организме трансгенных мышей, содержащих локусы иммуноглобулинов человека, которые способны после иммунизации вырабатывать полный репертуар антител человека в отсутствие выработки эндогенных иммуноглобулинов. Этот подход описан в патентах США №№ 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 и 5661016.

**[0324]** В одном варианте осуществления предусмотрен фрагмент (например, фрагмент антитела) антитела (например, антитела к В7-Н4). Известны различные методики получения фрагментов антител. Традиционно данные фрагменты получают посредством протеолитического расщепления интактных антител, как описано, например, в Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1993) и Brennan et al., Science 229:81 (1985). В одном варианте осуществления фрагменты антитела к В7-Н4 получают рекомбинантным путем. Все Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться *E. coli* или другими клетками-хозяевами, что таким образом обеспечивает получение больших количеств данных фрагментов. Такие фрагменты антител к В7-Н4 также можно выделять из рассмотренных выше фаговых библиотек антител. Фрагменты антител к В7-Н4 также могут представлять собой линейные антитела, описанные в патенте США № 5641870. Другие методики получения фрагментов антител будут очевидны практикующему специалисту.

**[0325]** В соответствии с настоящим изобретением методики можно адаптировать для получения одноцепочечных антител, специфических в отношении В7-Н4. См., например, патент США № 4946778. Кроме того, способы можно адаптировать для конструирования экспрессионных библиотек Fab для обеспечения быстрой и эффективной

идентификации моноклональных Fab-фрагментов с требуемой специфичностью в отношении В7-Н4 или их производных, фрагментов, аналогов или гомологов. См., например, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989). С помощью методик, известных из уровня техники, можно получать фрагменты антител, включая без ограничения: F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, получаемый посредством расщепления молекулы антитела пепсином; Fab-фрагмент, получаемый посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fab-фрагмент, получаемый посредством обработки молекулы антитела папаином и восстановителем, или Fv-фрагменты.

**[0326]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно модифицировать с целью увеличения их периода полужизни в сыворотке крови. Этого можно достичь, например, посредством введения эпитопа, связывающегося с рецептором реутилизации, в антитело или фрагмент антитела с помощью мутации соответствующей области в антителе или фрагменте антитела, или посредством введения эпитопа в пептидную метку, которую затем сливают с антителом или фрагментом антитела на любом конце или в середине (например, с помощью синтеза ДНК или пептида), либо с помощью мутации УТЕ. Из уровня техники известны другие способы увеличения периода полужизни антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в сыворотке крови, например, конъюгация с гетерологичной молекулой, такой как PEG.

**[0327]** Модифицированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, могут содержать переменную область любого типа, которая обеспечивает ассоциацию антитела или полипептида с В7-Н4. В связи с этим переменная область может содержаться в организме млекопитающего любого типа, у которого могут быть индуцированы гуморальный ответ и выработка иммуноглобулинов к требуемому антигену, или может быть получена из него. Так, переменная область антитела к В7-Н4 или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить, например, от человека, мыши, примата, отличного от человека (например, яванских макаков, макаков и т. п.), или представителя семейства волчьих. В одном варианте осуществления как переменные, так и константные области модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента являются человеческими. В одном варианте осуществления переменные области совместимого антитела (обычно полученные из источника, отличного от человека) можно конструировать или специфически оптимизировать с целью улучшения свойств связывания или снижения иммуногенности молекулы. В связи с этим переменные области, применимые в

настоящем изобретении, можно гуманизировать или иным образом изменять посредством включения импортируемых аминокислотных последовательностей.

**[0328]** В одном варианте осуществления переменные домены как тяжелых, так и легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изменяют посредством по меньшей мере частичной замены одной или нескольких CDR и/или посредством частичной замены каркасной области и изменения последовательности. Хотя CDR могут быть получены из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого получены каркасные области, предусматривается, что CDR будут получены из антитела другого класса и в определенных вариантах осуществления из антитела от другого вида. Для передачи антигенсвязывающей способности одного переменного домена другому замена всех CDR полными CDR из донорной переменной области не является необходимой. Напротив, необходимым является только перенос тех остатков, которые являются необходимыми для поддержания активности антигенсвязывающего сайта. С учетом пояснений, изложенных в патентах США №№ 5585089, 5693761 и 5693762, получение функционального антитела со сниженной иммуногенностью посредством проведения стандартных экспериментов будет находиться вполне в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

**[0329]** Без учета изменений в переменной области специалистам в данной области техники будет понятно, что модифицированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению будут предусматривать антитело (например, полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), в котором по меньшей мере часть одного или нескольких доменов константной области была подвергнута делеции или иным образом изменена с получением требуемых биохимических характеристик, таких как повышенная локализация в опухоли или сокращенный период полужизни в сыворотке крови, по сравнению с антителом с примерно такой же иммуногенностью, содержащим нативную или неизмененную константную область. В одном варианте осуществления константная область модифицированного антитела будет предусматривать константную область человека. Модификации константной области, совместимые с этим изобретением, включают добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах. То есть раскрытое в данном документе модифицированное антитело может предусматривать изменения или модификации одного или нескольких из трех константных доменов тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) и/или константного домена легкой цепи (CL). В одном варианте осуществления предполагается модифицированная константная область, где один или несколько доменов частично или полностью

подвергнуты делеции. В одном варианте осуществления модифицированное антитело будет содержать конструкции с подвергнутым делеции доменом или варианты, где был удален весь CH<sub>2</sub>-домен ( $\Delta$ CH<sub>2</sub>-конструкции). В одном варианте осуществления исключенный домен константной области может быть замещен коротким аминокислотным спейсером (например, из 10 остатков), который обеспечивает некоторую гибкость молекулы, которую обычно придает отсутствующая константная область.

**[0330]** Помимо их конфигурации, из уровня техники известно, что константная область опосредует некоторые эффекторные функции. Например, антитела связываются с клетками посредством Fc-области, при этом сайт связывания Fc-рецептора в Fc-области антитела связывается с Fc-рецептором (FcR) на клетке. Существует ряд Fc-рецепторов, являющихся специфичными в отношении антител различных классов, включая IgG (гамма-рецепторы), IgE (эта-рецепторы), IgA (альфа-рецепторы) и IgM (мю-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхностях клеток запускает ряд важных и разнообразных биологических ответов, в том числе поглощение и разрушение нагруженных антителами частиц, клиренс иммунных комплексов, лизис нагруженных антителами клеток-мишеней клетками-киллерами (называемый антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью или ADCC), высвобождение медиаторов воспаления, плацентарный перенос и контроль выработки иммуноглобулинов.

**[0331]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают измененные эффекторные функции, которые в свою очередь влияют на биологический профиль введенных антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) домена константной области может уменьшать степень связывания циркулирующего модифицированного антитела с Fc-рецепторами. В других случаях модификации константной области, соответствующие настоящему изобретению, могут ослаблять связывание комплемента и таким образом сокращать период полужизни в сыворотке крови и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Еще можно применять другие модификации константной области, обеспечивающие устранение дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, что обеспечивает усиление локализации благодаря повышенной специфичности в отношении антигена или гибкости антитела. Сходным образом, модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением можно без труда осуществлять с применением хорошо известных методик биохимической или молекулярной инженерии, которые находятся вполне в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

**[0332]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают одной или несколькими эффекторными функциями. Например, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают активностью, представляющей собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), и/или активностью, представляющей собой комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с Fc-рецептором и/или факторами системы комплемента. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают эффекторной функцией.

**[0333]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть сконструированы с обеспечением слияния CH3-домена непосредственно с шарнирной областью соответствующих модифицированных антител или их фрагментов. В других конструкциях между шарнирной областью и модифицированными CH2 и/или CH3-доменами может быть вставлен пептидный спейсер. Например, можно обеспечивать экспрессию совместимых конструкций, в которых CH2-домен был подвергнут делеции и оставшийся CH3-домен (модифицированный или немодифицированный) соединен с шарнирной областью с помощью спейсера из 5-20 аминокислот. Такой спейсер можно добавлять, например, для обеспечения того, что регуляторные элементы константного домена остаются свободными и доступными или что шарнирная область остается гибкой. Аминокислотные спейсеры могут в некоторых случаях оказаться иммуногенными и вызывать нежелательный иммунный ответ в отношении конструкции. В одном варианте осуществления любой спейсер, добавляемый в конструкцию, может быть относительно неиммуногенным или вовсе исключен с целью сохранения требуемых биохимических свойств модифицированных антител.

**[0334]** Наряду с делецией целых доменов константной области антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, можно модифицировать посредством частичной делеции или замены нескольких аминокислот или даже одной аминокислоты в константной области. Например, мутации одной аминокислоты в выбранных областях CH2-домена может быть достаточно, чтобы в значительной степени ослабить связывание Fc и таким образом повысить локализацию в опухоли. Сходным образом, один или несколько доменов константной области, которые контролируют эффекторную функцию (например, связывание C1Q комплемента), могут быть полностью или частично подвергнуты делеции. Такие частичные делеции константных областей могут обеспечивать улучшение выбранных характеристик антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, период полужизни в сыворотке

крови), сохраняя при этом другие требуемые функции, ассоциированные с соответствующим доменом константной области, в неизменном виде. Более того, константные области антитела и его антигенсвязывающего фрагмента можно модифицировать посредством мутации или замены одной или нескольких аминокислот, что усиливает профиль полученной конструкции. В связи с этим возможно возникновение нарушения активности, обеспечиваемой консервативным сайтом связывания (например, связывания Fc), с одновременным сохранением в значительной степени конфигурации и иммуногенного профиля модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления может быть осуществлено добавление одной или нескольких аминокислот к константной области для усиления требуемых характеристик, таких как ослабление или усиление эффекторной функции или обеспечение присоединения большего количества цитотоксинов или углеводов. В одном варианте осуществления могут потребоваться вставка или увеличение количества копий специфических последовательностей, полученных из выбранных доменов константной области.

**[0335]** Настоящее изобретение дополнительно охватывает варианты и эквиваленты, которые в значительной степени гомологичны антителу или антигенсвязывающему фрагменту по настоящему изобретению (например, мышинное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело или их антигенсвязывающие фрагменты). Они могут характеризоваться, например, наличием мутаций, обеспечивающих консервативные замены, т. е. замены одной или нескольких аминокислот на сходные аминокислоты. Например, консервативная замена относится к замене аминокислоты на другую из того же общего класса, как, например, одной кислой аминокислоты на другую кислотную аминокислоту, одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту или одной нейтральной аминокислоты на другую нейтральную аминокислоту. Из уровня техники широко известно, что подразумевается под консервативной заменой аминокислоты.

**[0336]** В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы они содержали дополнительные химические фрагменты, не являющиеся в обычных условиях частью белка. Данные дериватизированные фрагменты могут улучшать растворимость, биологический период полужизни или абсорбцию белка. Данные фрагменты могут также обеспечивать снижение или устранение любых требуемых побочных эффектов белков и т. п. Обзор таких фрагментов можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

## Определения

**[0337]** Следующие определения, в частности, касаются представленного выше описания ингибиторов топоизомеразы I, и даже более конкретно могут касаться раздела под названием "Дополнительные предпочтения".

**[0338]** C<sub>5</sub>-арилен: используемый в данном документе термин "C<sub>5</sub>-арилен" относится к двухвалентному фрагменту, полученному посредством удаления двух атомов водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения.

**[0339]** В данном контексте префиксы (например C<sub>5-6</sub>) обозначают количество атомов кольца или диапазон значений количества атомов кольца, будь то атомы углерода или гетероатомы.

**[0340]** Все атомы кольца могут представлять собой атомы углерода, как в "карбоариленовых группах", в таком случае группа представляет собой фенилен (C<sub>6</sub>).

**[0341]** В качестве альтернативы, атомы кольца могут включать один или несколько гетероатомов, как в "гетероариленовых группах". Примеры гетероариленовых групп включают без ограничения группы, полученные из:

N<sub>1</sub>: пиррола (азола) (C<sub>5</sub>), пиридина (азина) (C<sub>6</sub>);

O<sub>1</sub>: фурана (оксола) (C<sub>5</sub>);

S<sub>1</sub>: тиофена (тиола) (C<sub>5</sub>);

N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: оксазола (C<sub>5</sub>), изоксазола (C<sub>5</sub>), изоксазина (C<sub>6</sub>);

N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>: оксадиазола (фуразана) (C<sub>5</sub>);

N<sub>3</sub>O<sub>1</sub>: оксатриазола (C<sub>5</sub>);

N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: тиазола (C<sub>5</sub>), изотиазола (C<sub>5</sub>);

N<sub>2</sub>: имидазола (1,3-диазола) (C<sub>5</sub>), пиразола (1,2-диазола) (C<sub>5</sub>), пиридазина (1,2-диазина) (C<sub>6</sub>), пиримидина (1,3-диазина) (C<sub>6</sub>) (например, цитозина, тимина, урацила), пиазина (1,4-диазина) (C<sub>6</sub>); и

N<sub>3</sub>: триазола (C<sub>5</sub>), триазина (C<sub>6</sub>).

**[0342]** C<sub>1-4</sub>алкил: используемый в данном документе термин "C<sub>1-4</sub>алкил" относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 4 атомов углерода, который может быть алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Используемый в данном документе термин "C<sub>1-n</sub>алкил" относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до n атомов углерода, который может быть алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным

или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным).

Таким образом, термин "алкил" включает подклассы алкенил, алкинил, циклоалкил и т. д., рассмотренные ниже.

**[0343]** Примеры насыщенных алкильных групп включают без ограничения метил (C<sub>1</sub>), этил (C<sub>2</sub>), пропил (C<sub>3</sub>) и бутил (C<sub>4</sub>).

**[0344]** Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают без ограничения метил (C<sub>1</sub>), этил (C<sub>2</sub>), н-пропил (C<sub>3</sub>) и н-бутил (C<sub>4</sub>).

**[0345]** Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил (C<sub>3</sub>), изобутил (C<sub>4</sub>), втор-бутил (C<sub>4</sub>) и трет-бутил (C<sub>4</sub>).

**[0346]** C<sub>2</sub>-алкенил: используемый в данном документе термин "C<sub>2</sub>-алкенил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных двойных связей.

**[0347]** Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают без ограничения этенил (винил, -CH=CH<sub>2</sub>), 1-пропенил (-CH=CH-CH<sub>3</sub>), 2-пропенил (аллил, -CH-CH=CH<sub>2</sub>), изопропенил (1-метилвинил, -C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>) и бутенил (C<sub>4</sub>).

**[0348]** C<sub>2</sub>-алкинил: используемый в данном документе термин "C<sub>2</sub>-алкинил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных тройных связей.

**[0349]** Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают без ограничения этинил (-C≡CH) и 2-пропинил (пропаргил, -CH<sub>2</sub>-C≡CH).

**[0350]** C<sub>3</sub>-циклоалкил: используемый в данном документе термин "C<sub>3</sub>-циклоалкил" относится к алкильной группе, которая также является циклической группой, то есть к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома алициклического кольца циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, где фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, в том числе от 3 до 7 атомов кольца.

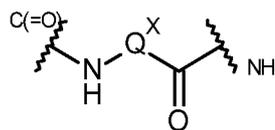
**[0351]** Примеры циклоалкильных групп включают без ограничения группы, полученные из

насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропана (C<sub>3</sub>) и циклобутана (C<sub>4</sub>); и

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропена (C<sub>3</sub>) и циклобутена (C<sub>4</sub>).



**[0352]** Маркировка связей: в формуле маркировка с помощью надстрочных индексов  $C(=O)$  и  $NH$  обозначает группу, с которой связаны атомы. Например, группа  $NH$  показана связанной с карбонилем (который не является частью проиллюстрированного фрагмента), и карбонил показан связанным с группой  $NH$  (которая не является частью проиллюстрированного фрагмента).

#### Соли

**[0353]** Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующей соли активного соединения/средства, например фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей рассмотрены в Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1-19 (1977).

**[0354]** Например, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например,  $-COOH$  может представлять собой  $-COO^-$ ), то может быть образована соль с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают без ограничения ионы щелочных металлов, такие как  $Na^+$  и  $K^+$ , катионы щелочноземельных металлов, такие как  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , и другие катионы, такие как  $Al^{+3}$ . Примеры подходящих органических катионов включают без ограничения ион аммония (т. е.  $NH_4^+$ ) и замещенные ионы аммония (например,  $NH_3R^+$ ,  $NH_2R_2^+$ ,  $NHR_3^+$ ,  $NR_4^+$ ). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, полученные из этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглюмина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером часто встречающегося иона четвертичного аммония является  $N(CH_3)_4^+$ .

**[0355]** Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например,  $-NH_2$  может представлять собой  $-NH_3^+$ ), то может быть образована соль с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

**[0356]** Примеры подходящих органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бензойной, камфорсульфоновой, коричной, лимонной,

эдетовой, этандисульфоновой, этансульфоновой, фумаровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изетионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоновой, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоновой, пропионовой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, янтарной, сульфаниловой, винной, толуолсульфоновой, трифторуксусной и валериановой кислоты. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих полимерных кислот: дубильной кислоты, карбоксиметилцеллюлозы.

#### Сольваты

**[0357]** Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующего сольвата активного соединения. Термин "сольват" используется в данном документе в общепринятом смысле и относится к комплексу растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Если растворитель представляет собой воду, то сольват может для удобства упоминаться как гидрат, например, моногидрат, дигидрат, тригидрат и т. п.

#### Изомеры

**[0358]** Определенные соединения/средства по настоящему изобретению могут существовать в одной или нескольких конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эпимерных, атропомерных, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая без ограничения цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и r- формы; эндо- и экзо-формы; R-, S- и мезо-формы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-)-формы; кето-, енольные и енолятные формы; син- и анти-формы; синклинальные и антиклинальные формы;  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы; аксиальные и экваториальные формы; формы "ванна", "кресло", "твист", "конверт" и "полукресло", и их комбинации, далее в данном документе обобщенно называемых "изомеры" (или "изомерные формы").

**[0359]** Термин "хиральный" относится к молекулам, которые обладают свойством не совпадать со своим зеркальным отражением при наложении, в то время как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые совпадают со своим зеркальным отражением при наложении.

**[0360]** Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичный химический состав, однако различаются расположением атомов или групп в пространстве.

**[0361]** Термин "диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более хиральными центрами, и молекулы которого не представляют собой зеркальные отражения друг друга. Диастереомеры обладают разными физическими свойствами, например, точками плавления, точками кипения, спектральными свойствами и реакционной способностью. Смеси диастереомеров можно разделять с применением высокочувствительных аналитических процедур, таких как электрофорез и хроматография.

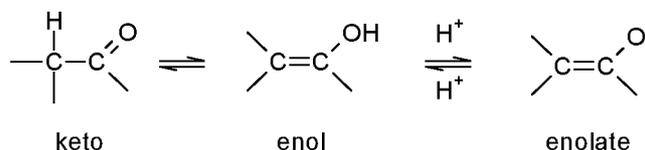
**[0362]** Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые являются несовпадающими зеркальными отражениями друг друга.

**[0363]** Стереохимические определения и условные обозначения, применяемые в данном документе, в целом следуют информации, указанной в P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Нью-Йорк; и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк, 1994. Соединения по настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существуют в разных стереоизомерных формах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединений по настоящему изобретению, включая без ограничения диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемические смеси, образуют часть настоящего изобретения. Множество органических соединений существуют в оптически активных формах, т. е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(centers). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения соединением плоскополяризованного света, где (-) или l означают, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для заданной химической структуры данные стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Определенный стереоизомер может также называться энантиомером, и смесь таких изомеров часто называется смесью энантиомеров. Смесь энантиомеров с соотношением 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, она может возникать при отсутствии стереоселекции или стереоспецифичности в ходе химической реакции или процесса. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух разновидностей энантиомеров, лишенных оптической активности.

**[0364]** Термин "энантимерно обогащенная форма" относится к образцу хирального вещества, где соотношение энантимеров составляет более чем 50:50, но менее чем 100:0.

**[0365]** Следует отметить, что за исключением рассмотренных ниже таутомерных форм, из используемого в данном документе термина "изомеры" специально исключены структурные (или конституционные) изомеры (т. е. изомеры, которые отличаются по связям между атомами, а не только по положению атомов в пространстве). Например, ссылку на метоксигруппу,  $-\text{OCH}_3$ , не следует истолковывать как ссылку на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . Сходным образом, ссылку на орто-хлорфенил не следует истолковывать как ссылку на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако ссылка на класс структур вполне может включать структурные изомерные формы, находящиеся в пределах данного класса (например,  $\text{C}_1$ -алкил включает н-пропил и изопропил; бутил включает н-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

**[0366]** Вышеуказанное исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енольным и енолятным формам, как, например, в случае следующих таутомерных пар: кето/енол (проиллюстрированы ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/ендиамин, нитрозо/оксим, тиокетон/ентиол, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/аци-нитро.



**[0367]** Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам, обладающим разной энергией, которые являются взаимопревращаемыми за счет низкого энергетического барьера. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают виды взаимопревращения за счет миграции протона, такие как кето-енольная и имин-енаминовая изомеризация. Валентные таутомеры включают виды взаимопревращения посредством реорганизации некоторых из связывающих электронов.

**[0368]** Следует отметить, что в термин "изомер" специально включены соединения с одним или несколькими изотопными замещениями. Например, H может находиться в любой изотопной форме, в том числе  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (D) и  $^3\text{H}$  (T); C может находиться в любой изотопной форме, в том числе  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{14}\text{C}$ ; O может находиться в любой изотопной форме, в том числе  $^{16}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$ , и т. п.

**[0369]** Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, хлора и йода, такие как без ограничения  $^2\text{H}$  (дейтерий, D),  $^3\text{H}$  (тритий),  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$  и  $^{125}\text{I}$ . Различные изотопно меченые соединения по настоящему изобретению, например соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{14}\text{C}$ . Такие изотопно меченые соединения могут быть применимы в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакции, методиках выявления или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (PET) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в ткани, или в лечении пациентов с применением радиоактивных веществ. Меченные или замещенные дейтерием терапевтические соединения по настоящему изобретению могут обладать улучшенными свойствами DMPK (метаболизм и фармакокинетика лекарственного средства) в отношении распределения, метаболизма и выведения (ADME). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, появляющиеся вследствие большей метаболической стабильности, например увеличение периода полужизни *in vivo* или снижение требуемых дозировок. Меченное  $^{18}\text{F}$  соединение может быть применимо для исследований с применением PET или SPECT. Изотопно меченые соединения по настоящему изобретению и их пролекарства, могут, как правило, быть получены посредством осуществления процедур, раскрытых на схемах или в примерах и способах получения, описанных ниже, посредством замещения реагента, не являющегося изотопно меченым, легко доступным изотопно меченым реагентом. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, в частности дейтерием (т. е.  $^2\text{H}$  или D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества, появляющиеся вследствие большей метаболической стабильности, например, увеличение периода полужизни *in vivo*, или снижение требуемых дозировок, или увеличение терапевтического индекса. Понятно, что дейтерий в данном контексте считается заместителем. Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может быть определена с помощью коэффициента изотопного обогащения. Считается, что в соединениях по настоящему изобретению любой атом, конкретно не обозначенный как определенный изотоп, представляет собой любой стабильный изотоп данного атома.

**[0370]** Если не указано иное, ссылка на определенное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе их (полностью или частично) рацемические и другие смеси. Способы получения (например асимметрический синтез) и разделения (например

фракционная кристаллизация и хроматографические способы) таких изомерных форм либо известны из уровня техники, либо их легко разрабатывать посредством адаптации способов, изложенных в данном документе, или известных способов известным образом.

### ГОМОЛОГИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0371]** Для определения процента идентичности можно использовать любой из разнообразных способов выравнивания последовательностей, в том числе без ограничения глобальные способы, локальные способы и гибридные способы, такие как, например, способы с сегментным подходом. Протоколы для определения процента идентичности являются стандартными процедурами в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Глобальные способы позволяют выравнивать последовательности от начала до конца молекулы и определять наилучшее выравнивание посредством суммирования баллов за отдельные пары остатков и посредством применения штрафов за гэпы. К неограничивающим способам относятся, например, CLUSTAL W, см., например, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) *Nucleic Acids Research* 4673-4680 (1994), и итеративное уточнение, см., например, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) *J. Mol. Biol.* 823-838 (1996). Локальные способы позволяют выравнивать последовательности посредством идентификации одного или нескольких консервативных мотивов, общих для всех вводимых последовательностей. К неограничивающим способам относятся, например, Match-box, см., например, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) *CABIOS* 501-509 (1992); генерация выборки по схеме Гиббса, см., например, C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) *Science* 208-214 (1993); Align-M, см., например, Ivo Van Waile et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) *Bioinformatics*:1428-1435 (2004).

**[0372]** Таким образом, процент идентичности последовательностей определяется традиционными способами. См., например, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-16, 1986, и Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-19, 1992. Вкратце, две аминокислотные последовательности выравнивают для оптимизации баллов выравнивания с применением штрафа за открытие гэпа, составляющего 10, штрафа за удлинение гэпа, составляющего 1, и матрицы замен "blosum 62" из публикации Henikoff и

Henikoff (там же), как показано ниже (аминокислоты обозначаются стандартными однобуквенными кодами).

**[0373]** "Процент идентичности последовательностей" между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей. Таким образом, % идентичности можно рассчитать как количество идентичных нуклеотидов/аминокислот, деленное на общее количество нуклеотидов/аминокислот, умноженное на 100. При расчетах % идентичности последовательностей также можно учитывать количество гэпов и длину каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнения последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более последовательностями можно проводить с применением специализированных математических алгоритмов, таких как BLAST, которые будут знакомы специалисту в данной области техники.

БАЛЛЫ ВЫРАВНИВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИДЕНТИЧНОСТИ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

**[0374]** Затем процент идентичности рассчитывают следующим образом:

общее количество идентичных совпадений

\_\_\_\_\_ x 100.

[длина более длинной последовательности плюс

количество гэпов, введенных в более длинную

последовательность с целью выравнивания двух последовательностей]

**[0375]** В значительной степени гомологичные полипептиды характеризуются наличием одной или нескольких аминокислотных замен, делеций или добавлений. Такие изменения предпочтительно носят незначительный характер, то есть представляют собой консервативные аминокислотные замены (см. ниже) и другие замены, которые не оказывают значительного влияния на фолдинг или активность полипептида; небольшие делеции, обычно от одной до приблизительно 30 аминокислот, и небольшие удлинения на

аминоконце или карбоксильном конце, такие как аминоконцевой остаток метионина, небольшой линкерный пептид до приблизительно 20-25 остатков или аффинная метка.

#### КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ

- |               |  |   |
|---------------|--|---|
| <b>[0376]</b> | Основные:  | аргинин; лизин; гистидин                    |
| <b>[0377]</b> | Кислые:  | глутаминовая кислота; аспарагиновая кислота |
| <b>[0378]</b> | Полярные:  | глутамин; аспарагин                         |
| <b>[0379]</b> | Гидрофобные:   | лейцин; изолейцин; валин                    |
| <b>[0380]</b> | Ароматические:   | фенилаланин; триптофан; тирозин             |
| <b>[0381]</b> | Небольшого размера:  | глицин; аланин; серин; треонин; метионин    |
| <b>[0382]</b> | В дополнение к 20 стандартным аминокислотам аминокислотные остатки |   |

полипептидов по настоящему изобретению могут быть заменены нестандартными аминокислотами (такими как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомасляная кислота, изовалин и  $\alpha$ -метилсерин). Аминокислотные остатки полипептида могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, и неприродных аминокислот. Полипептиды по настоящему изобретению также могут содержать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки.

**[0383]** Не встречающиеся в природе аминокислоты включают без ограничения транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, алло-треонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. Из уровня техники известны несколько способов включения не встречающихся в природе аминокислотных остатков в белки. Например, можно применять систему *in vitro*, в которой подавляются нонсенс-мутации с применением химически аминоацелированных супрессорных тРНК. Способы синтеза аминокислот и аминоацелирования тРНК известны из уровня техники. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, осуществляют в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. coli* S30, и коммерчески доступные ферменты, и другие реагенты. Белки очищают посредством хроматографии. См., например, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung et al., *Science* 259:806-9, 1993 и Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-9, 1993). Во втором способе трансляцию осуществляют в ооцитах представителей рода *Xenopus* посредством микроинъекции мутированной мРНК и химически аминоацелированных супрессорных тРНК (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991-8, 1996). В третьем способе клетки *E. coli*

культивируют в отсутствие природной аминокислоты, которую предполагается заменить (например, фенилаланин) и в присутствии требуемой(требуемых) не встречающейся(встречающейся) в природе аминокислоты(аминокислот) (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина или 4-фторфенилаланина). Не встречающаяся в природе аминокислота включается в полипептид вместо ее природного эквивалента. См. Koide et al., *Biochem.* 33:7470-6, 1994. Встречающиеся в природе аминокислотные остатки можно преобразовывать в не встречающиеся в природе соединения посредством химической модификации *in vitro*. Химическая модификация может быть скомбинирована с сайт-направленным мутагенезом для дополнительного расширения диапазона замещений (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

**[0384]** Аминокислотные остатки полипептидов по настоящему изобретению могут быть заменены ограниченным числом неконсервативных аминокислот, аминокислот, которые не кодируются генетическим кодом, не встречающихся в природе аминокислот и неприродных аминокислот.

**[0385]** Незаменимые аминокислоты в полипептидах по настоящему изобретению можно идентифицировать согласно процедурам, известным из уровня техники, таким как сайт-направленный мутагенез или мутагенез на основе аланинового сканирования (Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Сайты биологического взаимодействия также могут быть определены посредством физического анализа структуры, как определено посредством таких методик, как ядерный магнитный резонанс, кристаллография, электронная дифракция или фотоаффинное мечение, в сочетании с мутацией предполагаемых аминокислот сайта контакта. См., например, de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. Индивидуальный состав незаменимых аминокислот также может быть установлен на основе анализа показателей гомологии с родственными компонентами (например, транслокационными или протеазными компонентами) полипептидов по настоящему изобретению.

**[0386]** Различные аминокислотные замены могут быть осуществлены и протестированы с применением известных способов мутагенеза и скрининга, таких как способы, раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). Вкратце, данные авторы раскрывают способы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора функционального полипептида и последующего секвенирования подвергнутых мутагенезу полипептидов с определением спектра допустимых замен в каждом положении. К другим способам, которые можно использовать, относятся фаговый

дисплей (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США № 5223409; Huse, публикация WIPO WO 92/06204) и область-направленный мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

**[0387]** Различные аминокислотные замены могут быть осуществлены и протестированы с применением известных способов мутагенеза и скрининга, таких как способы, раскрытые в Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) или Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989). Вкратце, данные авторы раскрывают способы одновременной рандомизации двух или более положений в полипептиде, отбора функционального полипептида и последующего секвенирования подвергнутых мутагенезу полипептидов с определением спектра допустимых замен в каждом положении. К другим способам, которые можно использовать, относятся фаговый дисплей (например, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner et al., патент США № 5223409; Huse, публикация WIPO WO 92/06204) и область-направленный мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

**[0388]** Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. В Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994) и Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) специалист в данной области техники найдет общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

**[0389]** Настоящее изобретение не ограничено иллюстративными способами и материалами, раскрытыми в данном документе, и при осуществлении на практике или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, сходные с теми, которые описаны в данном документе, или эквивалентные им. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, любые последовательности нуклеиновой кислоты записываются слева направо в 5'-3'-ориентации; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу соответственно.

**[0390]** Заголовки, предусмотренные в данном документе, не ограничивают различные аспекты или варианты осуществления настоящего изобретения.

**[0391]** В данном документе для обозначения аминокислот используются название аминокислоты, трехбуквенное сокращение или однобуквенное сокращение. Используемый в данном документе термин "белок" включает белки, полипептиды и пептиды. Используемый в данном документе термин "аминокислотная

последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент". Термины "белок" и "полипептид" в данном документе используются взаимозаменяемо. В настоящем изобретении и в формуле изобретения могут использоваться традиционные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислотных остатков. 3-буквенный код для аминокислот определен в соответствии с Объединенной комиссией IUPAC/IUB по биохимической номенклатуре (JCBN). Также понятно, что полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью вследствие вырожденности генетического кода.

**[0392]** На протяжении описания могут встречаться другие определения терминов. Прежде чем будут описаны иллюстративные варианты осуществления более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления и поэтому они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается как ограничивающая, поскольку объем настоящего изобретения будет определяться исключительно прилагаемой формулой изобретения.

**[0393]** Если предусмотрен диапазон значений, подразумевается, что также конкретно раскрыто каждое промежуточное значение до десятых долей единицы нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределами данного диапазона. Объемом настоящего изобретения охватывается каждый меньший диапазон между любым заданным значением или промежуточным значением в заданном диапазоне и любым другим заданным или промежуточным значением в данном заданном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и каждый диапазон, в который включены один из пределов, ни один из них или оба из них, включен в меньшие диапазоны и также охватывается объемом настоящего изобретения с учетом любого специально исключенного предела в заданном диапазоне. Если заданный диапазон включает один или оба предела, в настоящее изобретение также включены диапазоны, исключаящие любой предел или оба данных включенных предела.

**[0394]** Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "средство" включает множество таких средств, и ссылка на "средство" включает ссылку

на одно или несколько средств и их эквивалентов, которые известны специалистам в данной области техники, и так далее.

**[0395]** Рассматриваемые в данном документе публикации приведены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно толковаться как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники по отношению к прилагаемой формуле изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0396]** Далее будут описаны варианты осуществления настоящего изобретения, исключительно в качестве примера, со ссылкой на следующие фигуры и примеры.

**[0397]** На **фигурах 1A – 1D** показана сверхэкспрессия B7-H4 при раке молочной железы. (A) TNBC (повторное лечение); (B) HR+ (предварительное лечение); (C) HER2+ (предварительное лечение, удовлетворяет требования для лечения герцептином); (D) HER2+ve (был подвергнут лечению герцептином).

**[0398]** На **фигурах 2A – 2L** показаны результаты касательно межвидовой перекрестной реактивности согласно ELISA-анализу.

**[0399]** На **фигурах 3A – 3G** показаны результаты анализа ELISA связывания клонов с представителями семейства B7-H4 и гомологами.

**[0400]** На **фигурах 4A – 4B** показаны результаты вестерн-блота в отношении поверхности клеток в отношении связывания выбранных клонов (и коммерческих антител) с различными типами клеток. E = 14-5949, представляющий собой IgG мыши к B7H4 человека, от E Biosciences; U = B0000-35B, представляющий собой IgG мыши к B7H4 человека, от US biological; R = AF2514, представляющий собой IgG1 козы к B7H4 мыши, от R and D systems; и S = SAB2500141, представляющий собой IgG1 козы к B7H4, от Sigma.

**[0401]** На **фигурах 5A – 5F** показаны результаты анализа на цитотоксичность *in vitro* с использованием выбранных клонов.

**[0402]** На **фигуре 6** показаны результаты анализа ELISA, проведенного для клона ZY0EQD\_E02 (а также ряда его вариантов), демонстрирующие связывание с B7-H4 человека, яванского макака, мыши и крысы.

**[0403]** На **фигуре 7** показаны результаты анализа ELISA, проведенного для клона E02\_GL по сравнению с 1D11, демонстрирующие улучшенное связывание E02\_GL с B7-H4 человека.

**[0404]** На **фигурах 8A – 8B** показаны результаты анализа с помощью проточной цитометрии, проведенного для клона E02\_GL по сравнению с 1D11, демонстрирующие улучшенное связывание E02\_GL с B7-H4 человека в случае присутствия на клетках.

Результаты для клеток HT29 показаны на (А), а результаты для клеток SKBR-3 показаны на (В). Символ  $\diamond$  обозначает 'фракцию E02-GL', а символ  $\square$  обозначает 'фракцию 1D11'. Символ "●" обозначает 'фракцию R347', представляющую собой (отрицательный) контроль.

**[0405]** На **фигурах 9А – 9В** показана цитотоксичность в отношении клеток Ad293, трансфицированных с помощью В7-Н4 человека (и нетрансфицированного контроля), после обработки конъюгатом E02-GL-SG3932. Незакрашенные кружки = изотипический контроль ADC (например, NIP228-SG3932); покрашенные кружки = E02-GL-SG3932.

**[0406]** На **фигурах 10А – 10В** показан неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vitro* (E02-GL-SG3932).

**[0407]** На **фигуре 11** показан неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vivo* (E02-GL-SG3932).

**[0408]** На **фигуре 12** показано, что E02-GL-SG3932 обладает сильной активностью *in vivo* в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата (PDX). Незакрашенные кружки = контроль, содержащий только среду-носитель; покрашенные кружки = E02-GL-SG3932 (7 мг/кг).

**[0409]** На **фигуре 13** показана противоопухолевая активность E02-GL-SG3932 в PDX-моделях после одной внутривенной инъекции при 7 мг/кг.

**[0410]** На **фигурах 14А – 14В** показано, что ADC, представляющие собой E02-GL-ингибитор топоизомеразы I, характеризуются сходной эффективностью в клетках MX-1 *in vitro* и *in vivo* (А); и в моделях, полученных из HT29, *in vitro* и *in vivo* (В).

**[0411]** На **фигурах 15А – 15В** показана цитотоксичность в отношении клеток НЕК293, трансфицированных с помощью В7-Н4 яванского макака (и нетрансфицированного контроля), после обработки конъюгатом E02-GL-SG3249.

**[0412]** На **фигурах 16А – 16С** показаны результаты экспериментов по поглощению, демонстрирующие поглощение связанного комплекса E02-GL-антиген живыми клетками.

**[0413]** На **фигурах 17А – 17В** показан анализ посредством вестерн-блота, демонстрирующий, что обработка с помощью E02-GL-SG3932 приводит к двухнитевым разрывам ДНК *in vitro*; (**фигура 17С**) показан анализ посредством вестерн-блота ключевых маркеров двухнитевого разрыва после обработки клеток НСС1569 антителом к В7-Н4, конъюгированным с SG3249, более конкретно E02-GL-SG3249.

**[0414]** На **фигуре 18** показана активность каспазы 3/7 в клетках SKBR3 после обработки с помощью E02-GL-SG3249.

[0415] На **фигуре 19** показана активность *in vitro* E02-GL-SG3249 и поражающего элемента SG3199 в опухолевых клетках.

[0416] На **фигурах 20A – 20D** показан неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vitro* (E02-GL-SG3249).

[0417] На **фигурах 21A – 21C** показано, что ADC на основе E02\_GL обладают улучшенной цитотоксичностью/эффективностью по сравнению с ADC на основе 1D11. Показана сравнительная цитотоксичность в отношении линии клеток HT29, экспрессирующей B7-H4 человека (A), линии клеток SKBR3 (B) и линии клеток HCC1569 (C).

[0418] На **фигурах 22A – 22C** показана активность *in vivo* E02-GL-SG3249 в отношении трансплантатов опухоли из (A) клеток OVCAR4 (невосприимчивый к цисплатину рак яичника, высокий уровень B7-H4), (B) клеток HCC1569 (HER2+ рак молочной железы, неоднородная экспрессия B7-H4) и (C) клеток MDA-MB-468 (трижды отрицательный рак молочной железы, низкий уровень экспрессии B7-H4).

[0419] На **фигуре 23** показан неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vivo*.

[0420] На **фигурах 24A – 24O** показано, что E02-GL-SG3249 обладает сильной активностью *in vivo* в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата (PDX). Кружки = контроль, содержащий только среду-носитель; квадраты = E02-GL-SG3249 (0,3 мг/кг); треугольники = E02-GL-SG3249 (1,0 мг/кг).

[0421] На **фигурах 25A – 25B** показаны результаты (A) иммуногистохимического исследования (ИHC) в отношении гамма-H2AX в ксенотрансплантате опухоли из HCC1954 (с и без E02-GL-SG3249) с количественным определением (B) количества гамма-H2AX-положительных клеток на мм<sup>2</sup> (в пределах области ткани, представляющей интерес) (+/- S.E.M.). Анализ изображений проводили с применением программного обеспечения HALO (с CRO-OracleBio). Повышенные количества гамма-H2AX-положительных опухолевых клеток наблюдали вплоть до 10 дней после обработки с помощью E02-GL-SG3249.

[0422] На **фигурах 26A – 26D** показано удержание Ab к B7-H4 в B7H4-экспрессирующей опухоли (клетках HT29). На шкале интенсивности показана интенсивность эпифлуоресценции. Эффективность источника излучения =  $(\text{ф/с/см}^2/\text{ср})/(\text{мкВт/см}^2)$ ; шкала интенсивности: Min =  $1,20 \cdot 10^8$ , Max =  $1,50 \cdot 10^9$ .

[0423] На **фигурах 27A – 27D** показано удержание Ab к B7-H4 в B7H4-экспрессирующей опухоли (клетки CT26). На шкале интенсивности показана интенсивность эпифлуоресценции. Эффективность источника излучения =  $(\text{ф/с/см}^2/\text{ср})/(\text{мкВт/см}^2)$ ; шкала интенсивности: Min =  $1,20 \cdot 10^8$ , Max =  $1,50 \cdot 10^9$ .

[0424] На **фигурах 28А – 28В** показано выравнивание последовательностей пяти иллюстративных клонов антитела.

[0425] На **фигуре 29А** представлено схематическое изображение нацеливающегося на В7-Н4 TOP1i-ADC. На **фигуре 29В** показаны ключевые признаки нацеливающегося на В7-Н4 TOP1i-ADC, представляющего собой E02-GL-SG3249.

[0426] На **фигуре 30** показаны иллюстративные изображения репрезентативного иммуногистохимического окрашивания в отношении экспрессии В7-Н4 в нормальных тканях молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, эндометрия, фаллопиевой трубы/яйцевода и почки человека и яванского макака.

[0427] На **фигуре 31** показаны иллюстративные изображения репрезентативного иммуногистохимического окрашивания в отношении экспрессии В7-Н4 в тканях опухолей человека, в том числе в опухоли молочной железы (TNBC и ER+, см. отдельные фигуры 1А – 1В), холангиокарциноме, NSCLC-SCC, опухоли эндометрия и яичника.

[0428] На **фигуре 32** представлено выравнивание ортологов В7-Н4.

[0429] На **фигуре 33** показано связывание промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, и E02-GL-SG3932 к В7-Н4 человека с помощью способа DELFIA-ELISA, а также антитела к IgG человека (H+L). E02-INT: промежуточное соединение E02-GL-SG3932, представляющее собой антитело; NIP228: совпадающий по изотипу контроль; huВ7-Н4: рекомбинантный В7-Н4 человека.

[0430] На **фигуре 34** показано связывание промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, с клетками HEK293, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека, мыши или яванского макака. E02-INT: промежуточное соединение E02-GL-SG3932, представляющее собой антитело; HEK293 JI TREX: не подвергнутые трансдукции клетки HEK293 JI TREX; HEK293 JI TREX супоВ7-Н4: клетки HEK293, стабильно экспрессирующие В7-Н4 яванского макака; HEK293 JI TREX huВ7-Н4: клетки HEK293, стабильно экспрессирующие В7-Н4 человека; HEK293 JI TREX muВ7-Н4: клетки HEK293, стабильно экспрессирующие В7-Н4 мыши; MFI: средняя интенсивность флуоресценции. Ось у представляет собой среднее геометрическое средней интенсивности флуоресценции. Данные представлены в виде среднего значения на основе определений в трех повторностях  $\pm$  SD.

[0431] На **фигуре 35** показано связывание промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, и E02-GL-SG3932 с линиями клеток рака молочной железы человека и с клетками HT29, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека. E02-INT: промежуточное соединение E02-GL-SG3932, представляющее собой антитело; HT29-huВ7-Н4-клон-4 и HT29-huВ7-Н4-клон-26: клетки HT29, стабильно экспрессирующие В7-

H4 человека; MFI: средняя интенсивность флуоресценции. Ось у представляет собой среднее геометрическое средней интенсивности флуоресценции.

**[0432]** На **фигурах 36A – 36C** показана цитотоксическая активность *in vitro* E02-GL-SG3932 в линиях клеток HT29, HT29-huB7-H4-клон-26 и MX-1. Данные представлены в виде среднего значения на основе определений в трех повторностях  $\pm$  SD.

**[0433]** На **фигуре 37** показана активность, представляющая собой антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность, E02-GL-SG3932 *in vitro*. График демонстрирует среднее кратное изменение  $\pm$  SEM на основе шести экспериментов.

**[0434]** На **фигуре 38** показана временная динамика поглощения E02-INT, представленная в виде последовательности изображений. Клетки рака толстой кишки человека HT29-huB7-H4-клон-26 (1-й ряд) и клетки рака молочной железы человека MX-1 (2-й ряд) мечены с помощью 5 мкг/мл E02-INT, конъюгированного с Alexa Fluor™ 568 (красный цвет). Масштабная линейка составляет 20 мкм.

**[0435]** На **фигурах 39A – 39C** показана визуализация на живых клетках поглощения E02-INT линиями клеток рака человека HT29-huB7-H4-клон-26 и MX-1. (A) Каждая точка представляет собой среднее процентное значение поглощения  $\pm$  стандартное отклонение, рассчитанное по результатам для 3 независимых лунок, при этом значения получены с 10-минутными интервалами в течение 480 минут. Показаны (B) процентное значение поглощения через 8 часов и (C) предполагаемый период полужизни, рассчитанный по результатам для 3 независимых лунок. Эти значения были получены с применением уравнения "диссоциация - однофазное экспоненциальное уменьшение". Горизонтальные столбики указывают внутригрупповое арифметическое среднее; статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего ANOVA, критерия множественного сравнения Тьюки. ns: не значимый,  $p > 0,05$ ; \*\*  $p < 0,05$ .

**[0436]** На **фигурах 40A – 40B** показано, что антитело E02-INT локализуется совместно с лизосомами в клетках HT29-huB7-H4-клон-26. (A) клетки HT29-huB7-H4-клон-26 инкубировали в течение 24 часов с 5 мкг/мл антитела E02-INT, конъюгированного с Alexa Fluor™ 568 [(A) красный цвет – верхняя и нижняя левая части]. Лизосомы окрашивали антителами мыши к LAMP1 человека с Alexa Fluor™ 488 [(A) зеленый цвет – верхняя средняя часть]. Эндосомы окрашивали кроличьими антителами к EEA1 человека и выявляли с помощью антитела козы к кроличьему IgG1 с DyLight™ 650 [(A) зеленый цвет – нижняя средняя часть]. Совместная локализация E02-INT с LAMP1 или EEA1 показана на наложенных изображениях. (B) Совместную локализацию E02-INT с EEA1 и LAMP1 анализировали с помощью коэффициента корреляции Пирсона с применением

программного обеспечения Zeiss Zen. Каждая точка представляет собой измерение одной клетки. Статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего ANOVA, критерия множественного сравнения Тьюки. ns: не значимый,  $p > 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**[0437] Фигура 41** представляет собой фотографию геля, показывающую передачу сигнала в ответ на повреждение ДНК в клетках MX-1, обработанных с помощью E02-GL-SG3932 или поражающего элемента SG3924, представляющего собой TOP1i.

Представленные данные являются репрезентативными в отношении  $n$ : 2 экспериментов.

**[0438] Фигура 42** представляет собой фотографию геля, показывающую передачу сигнала в ответ на повреждение ДНК в клетках HT29-huB7-H4, обработанных с помощью E02-GL-SG3932 или поражающего элемента SG3924, представляющего собой TOP1i.

Представленные данные являются репрезентативными в отношении  $n$ : 2 экспериментов.

**[0439] Фигуры 43A – 43F** представляют собой изображения, полученные в результате иммуногистохимического (ИНС) окрашивания в отношении IgG,  $\gamma$ H2AX и расщепленной каспазы 3 человека в ксенотрансплантатных опухолях из HT29-huB7-H4-клон-26 после обработки с помощью E02-GL-SG3932. Изображения являются репрезентативными в отношении ИНС окрашивания в отношении IgG,  $\gamma$ H2AX и расщепленной каспазы-3 человека в модели на основе ксенотрансплантата опухоли из HT29-huB7-H4-клон-26 через 168 часов после одного IV введения 7 мг/кг E02-GL-SG3932 (43D – 43F) или совпадающего по изотипу контрольного ADC, представляющего собой NIP228-SG3932 (43A – 43C).

**[0440] На фигурах 44A – 44D** показаны данные анализа изображений, полученных в результате ИНС окрашивания в отношении IgG,  $\gamma$ H2AX и расщепленной каспазы-3 человека во все моменты времени и при всех вариантах обработки в исследовании ксенотрансплантата из HT29-huB7-H4-клон-26. Верхняя панель (44A): анализ эпителиальных клеток, на которой показано изменение фракции IgG-положительных эпителиальных клеток человека относительно всех эпителиальных клеток со временем. Вторая панель (44B): анализ  $\gamma$ H2AX, на которой показана фракция эпителиальных клеток, которые оказались положительными в отношении очагов в анализе  $\gamma$ H2AX. Третья панель (44C): расщепленная каспаза 3 (CC-3), на которой показан процент положительных по расщепленной каспазе-3 опухолевых клеток в образцах со временем. Нижняя панель (44D): значение плотности клеток для всех эпителиальных клеток в образце со временем, которое показывает гибель клеток в результате обработки с помощью E02-GL-SG3932 по сравнению с совпадающим по изотипу контрольным NIP228-SG3932.

**[0441] На фигурах 45A – 45B** показана эффективность E02-GL-SG3932 в модели на основе ксенотрансплантата из B7-H4-отрицательных HT29 (также см. фигуру 11).

Значения представляют собой среднее значение объемов опухоли  $\pm$  SEM для  $n$ : 8 животных на группу. Пунктирная линия обозначает день введения доз.

**[0442]** На **фигурах 46А – 46С** показана эффективность E02-GL-SG3932 в модели на основе ксенотрансплантата из HT29-huB7-H4-клон-26. Значения представляют собой среднее значение объемов опухоли  $\pm$  SEM для  $n$ : 10 или 8 животных на группу.

Пунктирная линия обозначает день введения доз.

**[0443]** На **фигурах 47А и 47В** показана эффективность E02-GL-SG3932, NIP228-SG3932 и E02-INT в модели на основе ксенотрансплантата из MX-1. Значения представляют собой среднее значение объемов опухоли  $\pm$  SEM для  $n$ : 8 животных на группу. Пунктирная линия обозначает день введения доз.

**[0444]** На **фигуре 48** показана эффективность E02-GL-SG3932 и NIP228-SG3932 в модели на основе ксенотрансплантата из MX-1. Значения представляют собой среднее значение объемов опухоли  $\pm$  SEM для  $n$ : 3 или 6 животных на группу.

**[0445]** На **фигуре 49** показана эффективность E02-GL-SG3932 и NIP228-SG3932 в модели на основе ксенотрансплантата из MDA-MB-468. Значения представляют собой среднее значение объемов опухоли  $\pm$  SEM для  $n$ : 3 или 6 животных на группу.

**[0446]** На **фигуре 50** показаны данные касательно экспрессии B7-H4 в количественном анализе изображений в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата (PDX), отсортированные по усредненному значению случаев среднего значения OD клеточной мембраны. Уровень экспрессии представлен посредством цветовой кодировки с использованием класса интенсивности ИHC-окрашивания клеток (отсутствует: черный, 1+: белый, 2+: светло-серый, 3+: темно-серый).

**[0447]** На **фигуре 51** показана противоопухолевая активность, полученная в результате одного введения 1,25 мг/кг E02-GL-SG3932 или NIP228-SG3932 в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата.

**[0448]** На **фигурах 52А и 52В** показана экспрессия B7-H4 в PDX-моделях, группированных в соответствии с ответом опухоли на E02-GL-SG3932 или NIP228-SG3932 при уровне дозы 1,25 мг/кг. Модели считали восприимчивыми (R) к тестируемым средствам, если изменение объема опухоли в процентах по сравнению с исходным уровнем составляло от -30% до -100% включительно. Модели считали невосприимчивыми (NR), если изменение объема опухоли в процентах по сравнению с исходным уровнем составляло более чем -30%. На оси  $y$  указан уровень B7-H4 в каждой модели, определенный с помощью H-балла.

**[0449]** На **фигуре 53А** показана противоопухолевая активность, полученная в результате одного введения 3,5 мг/кг E02-GL-SG3932 или NIP228-SG3932 в моделях на

основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата. На **фигурах 53В – 53Е** показаны результаты выполнения протокола исследования для определения корреляции между введением E02-GL-SG3932, уровнем экспрессии В7-Н4 и дефицитом HR при введении (A) 1,25 мг/кг E02-GL-SG3932, (B) 3,5 мг/кг E02-GL-SG3932, (C) 1,25 мг/кг изотипического контроля ADC и (D) 3,5 мг/кг изотипического контроля ADC. На **фигурах 53В – 53Е** символ треугольника "Δ" обозначает модели с нарушением гомологичной рекомбинации (что определяют с помощью анализа на мутации BRCA или очаги RAD51). Символ круга "●" обозначает модели без дефектов гомологичной рекомбинации.

[0450] На **фигурах 54А и 54В** показана экспрессия В7-Н4 в PDX-моделях, группированных в соответствии с ответом опухоли на E02-GL-SG3932 или NIP228-SG3932 при уровне дозы 3,5 мг/кг. Модели считали восприимчивыми (R) к тестируемым средствам, если изменение объема опухоли в процентах по сравнению с исходным уровнем составляло от -30% до -100% включительно. Модели считали NR, если изменение объема опухоли в процентах по сравнению с исходным уровнем составляло более чем -30%. На оси у указан уровень В7-Н4 в каждой модели, определенный с помощью H-балла.

[0451] На **фигурах 55А – 55G** показано изменение среднего объема опухоли со временем для первой панели мышинных PDX-моделей холангиокарциномы, обработанных одной дозой, составлявшей 1,25 мг/кг или 3,5 мг/кг E02-GL-SG3932, по сравнению таковым у необработанных мышей.

[0452] На **фигурах 56А – 56К** показано изменение среднего объема опухоли со временем для второй панели мышинных PDX-моделей холангиокарциномы, обработанных одной дозой, составлявшей 1,25 мг/кг или 3,5 мг/кг E02-GL-SG3932, по сравнению таковым у необработанных мышей.

[0453] На **фигурах 57А – 57В** показано, что ADC, полученный с использованием расщепляемой конструкции mal-PEG8-линкер val-ala-поражающий элемент, является наиболее активным *in vivo* по сравнению с ADC 2-4. **Фигура 57А** представляет собой ключ к **фигуре 57В**.

[0454] На **фигуре 58** показано, что ADC с расщепляемой конструкцией mal-PEG8-линкер val-ala-поражающий элемент проявляет наилучший профиль безопасности в исследовании токсичности на крысах по сравнению с ADC 2-4.

[0455] На **фигурах 59А – 59В** показано, что ADC с расщепляемой конструкцией mal-PEG8-линкер val-ala-поражающий элемент характеризуется хорошими свойствами PK и наиболее широким относительным TI по сравнению с ADC 2-4. Относительный TI = отношение воздействия в виде AUC при наивысшей протестированной дозе у крыс

(NOAEL, не HNSTD) к AUC, при которой обеспечивается стазис опухоли (модель из MX-1). **Фигура 59А** представляет собой ключ к **фигуре 59В**.

**[0456]** На **фигурах 60А – 60В** показано, что E02-GL-SG3932 характеризуется устойчивой активностью в мышинных PDX-моделях из клеток молочной железы и яичника.

**[0457]** На **фигуре 61** показано, что E02-GL-SG3932 характеризуется устойчивой активностью в опухолях с дефицитом HR и в опухолях с профицитом HR с повышенным уровнем В7-Н4.

**[0458]** На **фигурах 62А – 62В** показан ответ опухоли в PDX-моделях с дефицитом HR (А) и с профицитом HR (В), сгруппированных в соответствии с ответом опухоли на E02-GL-SG3932 при уровне дозы 3,5 мг/кг. (R) указывает на то, что модели считались восприимчивыми к тестируемым средствам. (NR) указывает на то, что модели считались невосприимчивыми. На оси у указан уровень В7-Н4 в каждой модели, определенный с помощью Н-балла.

**[0459]** На **фигурах 62С – 62D** показан ответ опухоли в PDX-моделях с дефицитом HR (А) и с профицитом HR (В), сгруппированных в соответствии с ответом опухоли на E02-GL-SG3932 при уровне дозы 1,25 мг/кг. (R) указывает на то, что модели считались восприимчивыми к тестируемым средствам. (NR) указывает на то, что модели считались невосприимчивыми. На оси у указан уровень В7-Н4 в каждой модели, определенный с помощью Н-балла.

**[0460]** На **фигуре 63** показаны результаты 6-дневных анализов цитотоксичности разных поражающих элементов в DLD1 дикого типа или BRCA2-/- клетках. MMAE = отрицательный контроль, поражающий элемент, представляющий собой ингибитор микротрубочек.

## ПРИМЕРЫ

### МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

#### Белковые реагенты

**[0461]** Полученные белковые реагенты (например, конструкции) показаны в таблице 1. В таблице указано, из какого вида происходит белок (человека, мыши или яванского макака), вектор, применяемый для клонирования конструкции, и была ли применяемая лидерная последовательность нативной или представляла собой лидерную последовательность CD33 человека.

Таблица 1. Белковые конструкции, полученные для исследовательской работы с B7H4

<b>Клонированная вставка</b>	<b>Вектор</b>	<b>Комментарии</b>
ECD B7H4 человека	pDest12.2 oriP_Fc_6His	Нативная лидерная последовательность
ECD B7H4 мыши	pDest12.2 oriP_Fc_6His	Нативная лидерная последовательность
ECD B7H4 человека	pDest12.2 oriP_Flag_10His	Нативная лидерная последовательность
ECD B7H4 мыши	pDest12.2 oriP_Flag_10His	Нативная лидерная последовательность
ECD B7H4 суро	pDest12.2 oriP_Flag_10His	Нативная лидерная последовательность
ECD B7H4 человека	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	Нативная лидерная последовательность Fc с тройной мутацией
ECD B7H4 мыши	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	Нативная лидерная последовательность Fc с тройной мутацией
ECD B7H4 суро	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	Нативная лидерная последовательность Fc с тройной мутацией
ECD B7H4 человека	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	Лидерная последовательность CD33 человека
ECD B7H4 человека	pDest12.2 oriP_N_CD33_C_mIgG2a_Fc_10His	Лидерная последовательность CD33 человека
ECD (SV) B7H4 человека	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	Лидерная последовательность CD33 человека Сплайс-вариант

**[0462]** "Fc с тройной мутацией" (ТМ) содержит мутации тройной мутации L234F/L235E/P331S в Fc-области, как ранее описано в Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1 июня 2008 г.; 64(Pt 6): 700-704 (включено в данный документ посредством ссылки). Во избежание неоднозначности толкования авторы настоящего изобретения предусматривают, что описанные далее в данном документе антитела также сохраняют их преимущественные свойства/профили связывания в отсутствие такой ТМ (например, где присутствует Fc дикого типа).

**[0463]** Все белки в таблице очищали с применением стандартных условий. Вкратце, экспрессию осуществляли в НЕК EBNA, концентрированных с применением установки для TFF-концентрирования, очищенных с применением колонки с His-ловушкой или колонки с белком G (в зависимости от того, присутствует ли метка 10His Flag или присутствует метка Fc) с последующей конечной стадией тонкого фильтрования с помощью колонки SEC S200.

#### ELISA

**[0464]** Связывание антител к B7-H4 (например, промежуточного ZY0EQD-E02-GL и D11, представляющего собой mAb к B7-H4) с B7-H4 (например, B7-H4 человека и мыши) измеряли с помощью ELISA. Рекомбинантные белки B7-H4-Fc (например, B7-H4-Fc человека и B7-H4-Fc мыши) разбавляли в DPBS с получением 5 мкг/мл раствора. Затем 50 мкл разбавленных исходных растворов добавляли в 96-луночные планшеты Nunc Maxiisorp. В контрольные лунки добавляли 50 мкл/лунка DPBS. Обеспечивали адсорбцию антигенов на планшетах в течение ночи при 4°C, промывали один раз с помощью DPBS и инкубировали с блокирующим буфером (3% вес./об. Marvel в DPBS) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты промывали один раз с помощью PBS и инкубировали в течение 1 часа с 6,4 пМ – 100 нМ антитела к B7-H4 (например, промежуточного ZY0EQD-E02-GL или D11, представляющего собой mAb к B7-H4), разбавленного в DPBS, содержащем 1% BSA, 0,3% Triton X-100. Затем планшеты промывали три раза с помощью PBS, содержащего 0,1% Tween, и инкубировали с конъюгированным с пероксидазой антителом козы к легкой цепи человека (Sigma Aldrich, Пул, Великобритания) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали пять раз с помощью PBS, содержащего 0,1% Tween. После 5-минутной инкубации с субстратом пероксидазы ТМВ реакцию останавливали путем добавления 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм (A<sub>450</sub>) измеряли с применением многоканального планшет-ридера Envision (Perkin Elmer, Сир-Грин, Великобритания).

Проточная цитометрия (для выявления связывания антитела с клетками, положительными в отношении В7-Н4)

**[0465]** Открепление клеток от поверхности колб для культивирования тканей осуществляли с помощью аккутазы (Gibco, Пейсли, Великобритания), осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в ледяном DPBS (Gibco, Пейсли, Великобритания). Жизнеспособные клетки подсчитывали на основе вытеснения трипанового синего с применением гемоцитометра. Значения плотности клеток регулировали до  $5 \times 10^6$  клеток/мл в DPBS. 100 мкл суспензии клеток ( $5 \times 10^5$  клеток) добавляли в 96-луночные планшеты с V-образным дном и помещали на лед. Затем клетки инкубировали с красителем Live/Dead fixable violet (ThermoFisher Scientific, Лафборо, Великобритания) в течение 20 минут на льду. После промывания буфером для проточной цитометрии (eBiosciences, Хатфилд, Великобритания) клетки инкубировали на льду в течение 30 минут в 100 мкл буфера для проточной цитометрии отдельно (неокрашенные контрольные клетки) или с дополнением AF647-мечеными антителами к В7Н4 (например, E02-GL или 1D11) или изотипическим контролем R347 при концентрации, находящейся в диапазоне от 10 мкг/мл до 78 нг/мл. Затем клетки промывали три раза с помощью 200 мкл ледяного буфера для проточной цитометрии, фиксировали с помощью 200 мкл 4% параформальдегида (Sigma Aldrich, Пул, Великобритания) в течение 20 минут и ресуспендировали в DPBS на льду для анализа с помощью проточной цитометрии на приборе FACSCanto II (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Программное обеспечение для цитометрического анализа FlowJo (Treestar, Ашленд, Орегон, США) применяли для количественного определения связывания антител с клетками следующим образом. Живые, одиночные клетки гейтировали на основе прямого рассеяния, бокового рассеяния и интенсивности флуоресценции Live/Dead violet и определяли среднее геометрическое интенсивности флуоресценции AF647 (MFI).

Анализ цитотоксичности

**[0466]** Открепление линий клеток от поверхности колб для культивирования тканей осуществляли с помощью аккутазы (Gibco, Пейсли, Великобритания), осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в средах для выращивания (McCoy 5A, 10% FBS, 400 мкг/мл G418 для HT29-hV7H4-клон-44, McCoy 5A, 10% FBS для SKBR3 и RPMI-1640, 10% FBS для HCC1569). Жизнеспособные клетки подсчитывали на основе вытеснения трипанового синего с применением гемоцитометра. Значения плотности клеток регулировали до  $2,7 \times 10^4$  клеток/мл в средах для выращивания. 75 мкл/лунка суспензии клеток ( $2 \times 10^3$  клеток) добавляли в 96-луночный белостенные обработанные

планшеты для культивирования тканей с прозрачным дном и культивировали в течение ночи в увлажненном инкубаторе для культивирования тканей при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

**[0467]** ADC (например, 1D11-ММАЕ, E02-GL-ММАЕ и E02-GL-SG3249) разбавляли в DPBS с получением исходных растворов с концентрациями 400 мкг/мл или 16 мкг/мл соответственно. Получали четырехкратные последовательные разбавления исходных растворов в DPBS. Затем 25 мкл разбавленных исходных растворов добавляли в лунки с культивируемыми клетками в двух повторностях с четырехкратным последовательным разбавлением антитела с десятью точками (например, 1D11-ММАЕ, или E02-GL-ММАЕ, или E02-GL-SG3249). К контрольным клеткам, подвергнутым имитационной обработке, добавляли DPBS в количестве 25 мкл/лунка.

**[0468]** Клетки культивировали в присутствии ADC или DPBS (контрольные клетки, подвергнутые имитационной обработке) в течение шести дней. Жизнеспособность клеток оценивали с применением анализа CellTiter-Glo®: в каждую лунку добавляли 100 мкл CellTiter-Glo® (Promega, Саутгемптон, Великобритания). Планшеты подвергали перемешиванию на настольном встряхивателе в течение 2 минут, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение дополнительных 10 минут. Люминесценцию измеряли с применением многоканального планшет-ридера Envision (Perkin Elmer, Сир-Грин, Великобритания). Эффективность антител (например, 1D11-ММАЕ, или E02-GL-ММАЕ, или E02-GL-SG3249) испытываемого образца определяли путем генерирования значений полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) с применением нелинейной регрессионной модели [log зависимости ответа от агониста – переменный угловой коэффициент (три параметра)] в GraphPad Prism, версии 7 (программное обеспечение GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния) и представляли в виде жизнеспособности клеток в процентах относительно контрольных клеток, подвергнутых имитационной обработке:

$$\left( \frac{\text{((обработанные клетки - фоновый уровень))}}{\text{(контрольные клетки, подвергнутые имитационной обработке - фоновый уровень)}} \right) \times 100.$$

Вестерн-блот в отношении поверхности клеток

**[0469]** Способ вестерн-блот в отношении поверхности клеток разрабатывали и применяли для анализа 5 иллюстративных клонов антитела со следующими клетками: клетки SKBR3, A549, OVCAR4 (все трансфицированные вектором, представляющим собой минус-цепь ДНК В7-Н4), CHO и НЕК (трансфицированные вектором, представляющим собой плюс- и минус цепи полноразмерной ДНК В7-Н4).

**[0470]** В дополнение к иллюстративным клонам антител также применяли следующие антитела (для сравнительных целей):

- 14-5949, представляющий собой IgG мыши к B7H4 человека, от E Biosciences;
- B0000-35B, представляющий собой IgG мыши к B7H4 человека, от US biological;
- AF2514, представляющий собой IgG1 козы к B7H4 мыши, от *R and D systems*;
- SAB2500141, представляющий собой IgG1 козы к B7H4, от *Sigma*;
- *izomun 1* CAT004 SP06-003;
- *izomun 2* нормального контроля IgG козы от R and D (AB-108C).

Анализ аффинности KinExA 3200

[0471] Fab EO2\_GL: SEC-фракция Fab EO2\_GL (33,4-34,5 мин, 07031802.D),

[0472] B7H4: hB7H4-ECD-Flag-His10 (4,34 мг мл<sup>-1</sup>, J Watson, 31/10/17).

Буферы KinExA

[0473] D-PBS с добавлением 0,02% азида натрия (VWR/Merck 103692K, номер партии: K35580906), 1 литр, стерильно фильтрованный через фильтр с размером пор 0,20 мкм.

[0474] D-PBS с добавлением 0,02% азида натрия (VWR/Merck 103692K, номер партии: K35580906) и 1 мг мл<sup>-1</sup> бычьего сывороточного альбумина (Sigma A-2058, номер партии: 108H0573), 1,0 литр, стерильно фильтрованный через фильтр с размером пор 0,20 мкм.

Вторичный реагент для выявления

[0475] Для выявления целых IgG или Fab применяли реагент для выявления на основе вторичного меченного DyLight649 антитела мыши к цепи H+L человека (Jackson Immunoresearch, 209-495-088, номер партии 91003). Содержимое флакона (~1 мг) разводили с помощью 800 мкл воды Milli-Q.

Минимальное биотинилирование по амину ECD B7H4 человека:

- белок: ECD B7H4 человека-FlagHis10 (4,34 мг мл<sup>-1</sup>, партия 1, 31 октября 2017 г.);
- источник: JWPur006;
- объем/буфер: 0,100 мл/PBS;
- масса белка (Да): 29053,57 Да;
- масса белка, подвергаемая биотинилированию = 0,434 мг;
- количество белка, подвергаемое биотинилированию (пмоль)  
0,000434 г/29054 Да = 1,494\*10<sup>-8</sup> моль (14938 пмоль);

биотинилирование:

- добавляли 10 мкл насыщенного  $\text{NaHCO}_3$  в D-PBS;
- реагент: Sulfo-NHS-LC-Biotin EZ link (Perbio/Pierce, номер продукта: 21335) в  $(1,0 \text{ мг мл}^{-1}$  в DMF);
- отношение белок:биотин для первого импульсного мечения: 1:0,5  
 $14938 \times 0,5 = 14938$ 
  - $7468/1797 \text{ пмоль мкл}^{-1} = 4,16 \text{ мкл}$ ;
- время начала: 16:07.; отбор образца: 16:35.
- Все это применялось в отношении уравновешенной с помощью модифицированного по Дульбекко PBS колонке PD-10.

Исследования с визуализацией *in vivo*

**[0476]** Клоны антитела (например, E02\_GL) метили с помощью 800CW (LI-COR Biosciences). R347, меченный 800CW, применяли в контрольных экспериментах.

**[0477]** Раковые клетки CT26/4T1/HT29, экспрессирующие B7-H4, трансплантировали (например, подкожно инокулировали) "голым" мышам возрастом 3-5 дней в левый бок (Charles River Laboratories, Уилмингтон, Массачусетс) и раковые клетки CT26/4T1/HT29, не экспрессирующие B7-H4, трансплантировали в правый бок с обеспечением внутреннего контроля. Мышей содержали в течение недели для развития опухолей, вводили путем инъекции 800CW-меченное E02\_GL. Контрольным мышам путем инъекции вводили 800CW-меченый R347. Визуализацию опухолей *in vivo* проводили в дни 1, 3, 7 и 9 после введения путем инъекции меченых антител путем визуализации излучения от метки.

#### ПРИМЕР 1

B7-H4 сверхэкспрессируется в различных типах клеток.

**[0478]** Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах из ряда срезов опухолей, отобранных у субъектов-людей, представляющих ряд типов опухолей (указанных в таблице 2). Определили, что экспрессия B7-H4 была особенно выражена при раке молочной железы (например, положительном по гормональным рецепторам (HR+) раке молочной железы), а также немелкоклеточной карциноме легкого (NSCLC) (см. фигуры 1A – 1D). Интересно заметить, что для большинства опухолей была показана неоднородная экспрессия.

**[0479]** У части пациентов экспрессия сохранялась после лечения (где пациенты с HER2+ раком молочной железы подвергались лечению герцептином; и пациенты с раком яичника подвергались лечению средством химиотерапии на основе платины).

Таблица 2.

Тип опухоли		% положит. <sup>1</sup>	% высок. положит. <sup>2</sup>	% низк. положит. <sup>3</sup>	Н оцененных
Молочной железы	HR+	85	23	51	39
	TNBC	70	32	23	230
	HER2+	87	42	28	98
	- удовлетворяет требования для лечения герцептином	83	43	20	30
	- подвергалась лечению герцептином	88	41	31	68
Яичника (серозная)		72	24	33	71
Эндометрия		84	35	48	39
NSCLC	Плоскоклеточная	63	15	48	160
	Аденокарцинома	19	2	15	143
Поджелудочной железы		31	1	18	90
Желудка		10	0	10	21
Холангиокарцинома		13	38	38	13

<sup>1</sup> Положительный: опухоли с окрашиванием любой интенсивности и частоты

<sup>2</sup> В высокой степени положительный: опухоли с окрашиванием мембраны с интенсивностью >2+ в >50% опухолевых клеток

<sup>3</sup> В низкой степени положительный: опухоли с окрашиванием мембраны с интенсивностью ≤2+ в <50% опухолевых клеток

Данные основаны на анализе с использованием тканевых микрочипов.

## ПРИМЕР 2

### Получение антител к B7-H4

**[0480]** Осуществляли стратегию повторной иммунизации в нескольких участках (RIMS), в которой мышью VelocImmune II (Regeneron, Тарритаун, Нью-Йорк) иммунизировали следующим образом:

- минус 4 дня: предварительный забор крови;
- 0 день: первичная иммунизация;
- 7 день: вторая бустерная доза;
- 13 день: первый забор крови;
- 15 день: третья бустерная доза;
- 20 день: второй забор крови;
- 22 день: четвертая бустерная доза;
- 24 день: пятая бустерная доза;
- 28 день: конечный забор крови и фузионная биопсия селезенки и лимфатических узлов.

**[0481]** Для иммунизации шестнадцать мышей V2 разделяли на 4 группы, в каждой группе содержалось по 4 животных. Животных иммунизировали рекомбинантным B7-H4 человека и мыши, а также клетками SkBr3 (например, которые экспрессируют B7-H4). Подробности касательно иммуногена можно найти в таблице 3 ниже (TT = столбнячный токсин; DTA = дифтерийный токсин; KLH = гемоцианин лимфы улитки).

Таблица 3.

Group N =4	Prime	2	3	4	5
G1	KLH-mB7H4	KLH-hB7H4	KLH-mB7H4	KLH-hB7H4	KLH-hB7H4
G2	KLH-mB7H4	SkBr3	KLH-mB7H4	SkBr3	SkBr3
G3	mB7H4-TT	KLH-hB7H4	mB7H4-TT	KLH-hB7H4	mB7H4-TT
G4	mB7H4-DTA	KLH-hB7H4	mB7H4-DTA	KLH-hB7H4	mB7H4-DTA

### Получение гибридомы

**[0482]** У 10 мышей собирали лимфоидные клетки, клетки от мышей 3 и 9 обогащали на В-клетки, в отношении клеток от других 8 мышей отбор не проводили. Лимфоидные клетки и клетки миеломы Sp2/0 Ag14 смешивали в соотношении 5:1,

промывали в бессывороточной среде и процедуры слияния проводили с применением PEG либо вручную, либо с помощью автоматического прибора tescan. После слияния клетки ресуспендировали в 200 мл полной среды NM20 и по 100 мкл добавляли в столбцы 1-11 20 планшетов. Через 3 дня в каждую лунку добавляли дополнительные 100 мкл среды. Подробности касательно слияния для каждой мыши показаны в таблице 4.

Таблица 4.

Мышь	Группа	Клетки селезенки, $\times 10^6$	Клетки лимфатических узлов, $\times 10^6$	Общее количество, $\times 10^6$	% клеток лимфатических узлов	Тип слияния	Отбор
1	1	57,72	13,78	71,50	19,27	Тесан	Отсутствует
3	1	73,42	10,35	83,77	12,36	Вручную	В-клетка
4	1	27,78	11,47	39,25	29,21	Тесан	Отсутствует
5	2	67,92	23,45	91,37	25,66	Тесан	Отсутствует
7	2	78,20	25,70	103,90	24,74	Тесан	Отсутствует
9	3	62,47	11,98	74,45	16,09	Вручную	В-клетка
10	3	53,43	5,25	58,68	8,95	Вручную	Отсутствует
11	3	50,80	9,25	60,05	15,40	Тесан	Отсутствует
13	4	41,33	11,98	53,30	22,47	Вручную	Отсутствует
14	4	38,20	34,30	72,50	47,31	Тесан	Отсутствует

*Скрининг и клонирование гибридомы*

**[0483]** Супернатанты, собранные через 13 дней после слияния, подвергали скринингу с помощью скрининга на IgG/IgM на основе гранул по группе гибридомы и с помощью биохимических анализов связывания методом HTRF для B7H4 человека, яванского макака и мыши, и с помощью FMAT-анализа SkBr3 с помощью HTS.

**[0484]** После скрининга отбирали положительные хиты, из которых 58 были клонированы с перенесением в полутвердые среды. Из каждого ряда лунок с применением ClonePix-FL отбирали положительные по IgG клоны, которые затем подвергали скринингу с помощью первичных анализов. Затем из каждого ряда лунок отбирали максимально 4 клон, которые выращивали и проводили очистку IgG в небольшом масштабе (Phytip с белком A).

**[0485]** После процедур биологического скрининга материала Phytip выбрали 5 иллюстративных антител для дальнейшего установления характеристик (подробности которого можно найти в таблице 5).

Таблица 5.

<b>ID клона</b>	<b>ID мыши</b>	<b>Иммуноген</b>
ZY0EPQ-E02	5	Группа 2 (клетки SkBr3/mB7H4-KLH)
ZY0EQD-E02	7	Группа 2 (клетки SkBr3/mB7H4-KLH)
ZY0EP0-C07	4	Группа 1 (mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH)
ZY0EOB-F05	1	Группа 1 (mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH)
ZY0EO5-E07	1	Группа 1 (mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH)

**[0486]** ZY0EPQ-E02 (и его версии, полученные путем обратной мутации к зародышевому типу, например, дополнительно обозначенные аббревиатурой "GL") содержит CHDR1-3 под SEQ ID NO: 1-3 (соответственно) и CLDR1-3 под SEQ ID NO: 4-6 (соответственно). ZY0EPQ-E02 содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 31 и VL под SEQ ID NO: 32.

**[0487]** ZY0EQD-E02 содержит CHDR1-3 под SEQ ID NO: 7-9 (соответственно) и CLDR1-3 под SEQ ID NO: 10-12 (соответственно). ZY0EQD-E02 содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 33 и VL под SEQ ID NO: 34. Полученная путем обратной мутации к зародышевому типу версия ZY0EQD-E02 далее обозначается, например, путем включения сокращения "GL" и обозначается, например, как EQD-E02\_GL (содержащая VH-цепь под SEQ ID NO: 45 и VL под SEQ ID NO: 34).

**[0488]** ZY0EOB-F05 содержит CHDR1-3 под SEQ ID NO: 13-15 (соответственно) и CLDR1-3 под SEQ ID NO: 16-18 (соответственно). ZY0EOB-F05 содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 35 и VL под SEQ ID NO: 36.

**[0489]** ZY0EO5-E07 содержит CHDR1-3 под SEQ ID NO: 19-21 (соответственно) и CLDR1-3 под SEQ ID NO: 22-24 (соответственно). ZY0EO5-E07 содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 37 и VL под SEQ ID NO: 38.

**[0490]** ZY0EP0-C07 содержит CHDR1-3 под SEQ ID NO: 25-27 (соответственно) и CLDR1-3 под SEQ ID NO: 28-30 (соответственно). ZY0EP0-C07 содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 39 и VL под SEQ ID NO: 40.

**[0491]** Для этих 5 иллюстративных антител изменяли формат на таковые, содержащие остовы IgG1 человека, IgG1-ТМ (тройная мутация) человека и IgG1 мыши.

**[0492]** Анализ последовательностей 5 иллюстративных антител с измененным форматом показывает идентичность между ZY0EPQ-E02 и ZY0EQD-E02, а также клонами ZY0EOB-F05 и ZY0EO5-E07 (см. фигуру 28).

## ПРИМЕР 3

## Анализы связывания антигена с выбранными клонами

**[0493]** Анализ зависимости концентрация-эффект для связывания 5 иллюстративных антител в виде IgG1 мыши, IgG1 человека и IgG1-ТМ человека проводили с применением В7-Н4-Fc человека, яванского макака и мыши с помощью HTRF-анализа. В случае антител IgG1 мыши для выявления применяли антитело к IgG мыши, конъюгированное с Dylight-649. Сходный формат анализа применяли с использованием антител IgG1 и IgG1-ТМ человека; однако для выявления применяли антитело к каппа-цепи человека, конъюгированное с Dylight-649.

**[0494]** Антитела ZY0EPQ-E02 и ZY0EQD-E02 характеризуются более высокой EC<sub>50</sub> и более низким максимальным значением связывания с В7-Н4-Fc мыши, чем с В7-Н4-Fc человека или яванского макака, что указывает на более низкую аффинность к В7-Н4 мыши. Все другие антитела характеризуются сходными значениями EC<sub>50</sub> и максимальным значением связывания с В7-Н4-Fc человека, яванского макака и мыши (см. таблицы 6-8).

Таблица 6. Данные HTRF, полученные при применении В7-Н4-Fc человека

Антитело	В7-Н4-Fc человека					
	IgG1 мыши		IgG1 человека		IgG1-ТМ человека	
	EC <sub>50</sub> (нМ)	Max	EC <sub>50</sub> (нМ)	Max	EC <sub>50</sub> (нМ)	Max
ZY0EPQ-E02	0,38	2741	0,38	1127	0,41	1092
ZY0EQD-E02	0,22	3166	0,35	1237	0,33	1272
ZY0EOB-F05	0,30	3025	0,15	1816	0,15	1873
ZY0E05-E07	0,68	2150	0,19	1708	Не тестировали	Не тестировали
ZY0EP0-C07	0,95	1736	0,30	1221	0,31	1207

Таблица 7. Данные HTRF, полученные при применении В7-Н4-Fc яванского макака

Антитело	В7-Н4-Fc суно					
	IgG1 мыши		IgG1 человека		IgG1-ТМ человека	
	EC <sub>50</sub> (нМ)	Max	EC <sub>50</sub> (нМ)	Max	EC <sub>50</sub> (нМ)	Max
ZY0EPQ-E02	0,38	2236	0,33	987	0,35	934
ZY0EQD-E02	0,22	2494	0,28	1127	0,28	1100
ZY0EOB-F05	0,32	2398	0,14	1483	0,15	1483
ZY0E05-E07	0,71	1698	0,18	1359	Не тестировали	Не тестировали
ZY0EP0-C07	1,28	1247	0,33	946	0,39	890

Таблица 8. Данные HTRF, полученные при применении В7-Н4-Fc мыши

Антитело	В7-Н4-Fc мыши					
	IgG1 мыши		IgG1 человека		IgG1-ТМ человека	
	EC50 (нМ)	Max	EC50 (нМ)	Max	EC50 (нМ)	Max
ZY0EPQ-E02	2,03	790	1,49	279	1,76	256
ZY0EQD-E02	3,64	447	1,40	167	1,44	224
ZY0EOB-F05	0,38	2190	0,19	1319	0,19	1342
ZY0E05-E07	0,73	1697	0,21	1300	He тестировали	He тестировали
ZY0EP0-C07	0,49	1910	0,18	1321	0,20	1252

Измерения аффинности связывания

**[0495]** Аффинность антитела к ECD В7-Н4 человека, мыши и его сплайс-вариантам измеряли с помощью системы ForteBio Octet. Антитела IgG1-ТМ человека захватывали с помощью белка G и измеряли связывание мономерной молекулы ECD В7-Н4-FLAG с антителом. Аффинность к В7-Н4 человека находилась в диапазоне 10-25 нМ, при этом аффинность к мышинному составляла от 10 до 600 нМ. Все антитела кроме ZY0EP0-C07 могли связывать сплайс-вариант, при этом значения аффинности находились в диапазоне от 200 до 1600 нМ. Кинетические параметры связывания обобщены в таблице 9 ниже.

Таблица 9. Обобщенные сведения по аффинности, полученные с помощью Octet

Антитело	Белок	hIgG1-ТМ (n = 4-7)			hIgG1 (n = 1)		
		KD (нМ)	kon (1/М с)	kdis (1/с)	KD (нМ)	kon (1/М с)	kdis (1/с)
ZY0EPQ- E02	В7-Н4 человека	25,7	7,09E+04	1,82*10 <sup>-03</sup>	24	8,59E+04	2,08*10 <sup>-03</sup>
	В7-Н4 мыши	396	7,67E+04	3,04*10 <sup>-02</sup>	498	1,00E+05	4,98*10 <sup>-02</sup>
	В7-Н4-SV	1660	1,38E+03	2,29*10 <sup>-03</sup>	1030	2,46E+03	2,52*10 <sup>-03</sup>
ZY0EQD- E02	В7-Н4 человека	14,4	1,93E+05	2,78*10 <sup>-03</sup>	14,9	2,16E+05	3,21*10 <sup>-03</sup>
	В7-Н4 мыши	621	2,03E+05	1,26*10 <sup>-01</sup>	625	3,41E+05	2,13*10 <sup>-01</sup>

	B7-H4-SV	801	3,36E+03	2,69*10 <sup>-03</sup>	834	4,19E+03	3,49*10 <sup>-03</sup>
ZY0EOB-F05	B7-H4 человека	13,4	2,65E+04	3,55*10 <sup>-04</sup>	11,7	3,10E+04	3,62*10 <sup>-04</sup>
	B7-H4 мыши	25	1,87E+04	4,76*10 <sup>-04</sup>	19,8	2,49E+04	4,93*10 <sup>-04</sup>
	B7-H4-SV	174	3,35E+03	5,84*10 <sup>-04</sup>	127	4,71E+03	5,98*10 <sup>-04</sup>
ZY0E05-E07	B7-H4 человека	19,8	1,71E+04	3,38*10 <sup>-04</sup>	14,6	2,17E+04	3,18*10 <sup>-04</sup>
	B7-H4 мыши	30	1,21E+04	3,61*10 <sup>-04</sup>	23,2	1,79E+04	4,15*10 <sup>-04</sup>
	B7-H4-SV	264	1,89E+03	4,99*10 <sup>-04</sup>	182	2,91E+03	5,28*10 <sup>-04</sup>
ZY0EP0-C07	B7-H4 человека	9,4	4,16E+04	3,97*10 <sup>-04</sup>	7	4,88E+04	3,63*10 <sup>-04</sup>
	B7-H4 мыши	11	4,30E+04	5,24*10 <sup>-04</sup>	9	6,02E+04	5,51*10 <sup>-04</sup>
	B7-H4-SV	Связывание отсутствует			Связывание отсутствует		

#### Эпитопная группировка

**[0496]** Эпитопную группировку проводили в формате HTRF-анализа с применением связывания иллюстративных антител (IgG1-ТМ), конъюгированных с DyLight-649, с мономерным ECD B7-H4-FLAG с выявлением с помощью конъюгированного с европием антитела к FLAG.

**[0497]** Была определена группа 1 с антителами ZY0EPQ-E02, ZY0EQD-E02 и ZY0E05-E07, которые полностью ингибировали друг друга и только частично ингибировали ZY0EP0-C07. Была определена группа 2 с антителом ZY0EOB-F05, полностью конкурирующим со всеми антителами, и все антитела полностью конкурируют с ним. Была определена группа 3 с ZY0EP0-C07, частично конкурирующим с антителами ZY0EPQ-E02, ZY0EQD-E02 и ZY0E05-E07 (группа 1).

Таблица 10. Таблица обобщенных сведений касательно эпитопов согласно HTRF

Конкурирующее антитело	Dy649-конъюгированное антитело				
	ZY0EPQ-E02	ZY0EQD-E02	ZY0EOB-F05	ZY0EO5-E07	ZY0EP0-C07
ZY0EPQ-E02	<b>Полностью</b>	Полностью	Полностью	<b>Не тестировали</b>	Частично
ZY0EQD-E02	Полностью	<b>Полностью</b>	Полностью		Частично
ZY0EOB-F05	Полностью	Полностью	<b>Полностью</b>		Полностью
ZY0EO5-E07	Полностью	Полностью	Полностью		Частично
ZY0EP0-C07	Частично	Частично	Полностью		<b>Полностью</b>

Межвидовая перекрестная реактивность согласно ELISA

**[0498]** Каждое из вышеуказанных 5 полученных от VelocImmune иллюстративных антител к В7-Н4 тестировали в отношении связывания с В7-Н4 мыши (ECD), полученным самостоятельно. Все иллюстративные антитела тестировали в виде IgG1-ТМ человека, параллельно с 4/5 IgG1 мыши (в то время ZY0EP0-C07 не был доступен в виде IgG1 мыши). Сравнивали связывание мономерных и димерных вариантов В7-Н4 мыши и человека (меченные FlagHis10 или FcHis6 соответственно).

**[0499]** Все IgG, независимо от изотипа, сохраняли перекрестную реактивность в отношении антигенов В7-Н4 как мыши, так и человека. Димерная природа FcHis6-меченных антигенов В7-Н4, обеспечивала кривые связывания, которые были равномерно сдвинуты влево по сравнению с такими кривыми, полученными для соответствующих мономерных антигенов В7-Н4-FlagHis10. Данный эффект был более выраженным для В7-Н4 мыши.

**[0500]** В случае любого из иллюстративных антител от VelocImmune не наблюдали значимого связывания с несоответствующими контрольными антигенами. IgG, представлявшие собой изотипический контроль, не связывались неспецифически с антигенами В7-Н4 (NIP228 – IgG1-ТМ человека и MOPC-21 – IgG1 мыши) – см. фигуру 2.

Специфичность коммерческих поликлональных и моноклональных антител к В7-Н4 согласно ELISA

**[0501]** Панель коммерческих иммунных сывороток, содержащих моноклональные и поликлональные антитела, тестировали в отношении связывания с антигенами В7-Н4 человека и мыши с помощью ELISA. Каждую иммунную сыворотку также тестировали в отношении связывания с усеченным сплайс-вариантом В7-Н4 человека (у которого фактически отсутствует его внеклеточный домен IgV). Эквивалентные данные получали независимо от того, применяли антигены В7-Н4 с FlagHis10 или FcHis6. Разные профили перекрестной реактивности обобщены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11. Моноклональные антитела

<i>Компания</i>	<i>№ по кат.</i>	<i>№ партии</i>	<i>B7-H4</i>		
			<i>Человека</i>	<i>Мыши</i>	<i>Сплайс-вариант</i>
AdD serotec	<u>MCA2632</u>	707	Да	Нет	Нет
eBioscience	<u>14-5949</u>	E021763	Да	Да	Да
Epitomics	<u>2516-1</u>	YD-08-23-02	Нет	Нет	Н. д.
US Biologicals	<u>B0000-35B</u>	L10061519	Да	Нет	Нет
eBioscience	<u>145972-82</u>	E010563	Да	Да	Да
eBioscience	<u>145970-85</u>	E010556	Нет	Нет	Н. д.
R & D	<u>MAB2154</u>	WVP0107101	Да	Да	Да

Таблица 12. Поликлональные антитела

<i>Компания</i>	<i>№ по кат.</i>	<i>№ партии</i>	<i>B7-H4</i>		
			<i>Человека</i>	<i>Мыши</i>	<i>Сплайс-вариант</i>
Santa Cruz	<u>sc68872 (H108)</u>	L1008	Да	Да	Н. д.
Santa Cruz	<u>sc68254 (G-18)</u>	C1910	Нет	Нет	Н. д.
R & D	<u>AF2154</u>	WVP016011	Да	Да	Да
Abbiotec	<u>250473</u>	10051104	Нет	Нет	Н. д.
Sigma Aldrich	<u>SAB2500141</u>	7942P1	Да	Да	Нет

Специфичность в отношении гомологов B7-H4 согласно ELISA

**[0502]** Каждый из пяти выбранных клонов (IgG от VelocImmune) тестировали в отношении неспецифического связывания с представителями семейства и гомологами B7-H4 (ZY0EP0-C07, представляющий собой IgG1 мыши, был доступен для тестирования). При выборе того, какие антигены тестировать, руководились результатами проведения поиска в BLASTP с применением ECD B7-H4 человека в качестве тестовой последовательности. Подходящие хиты из данного перечня затем выравнивали с применением анализа CLUSTALW и отбирали те антигены, которые демонстрировали наивысшее процентное значение идентичности на первичном аминокислотном уровне (см. таблица 13).

Таблица 13.

		Percent Identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Р а с с о ж д е н и е	1	■	13.2	21.5	21.4	25.9	21.6	20.7	25.4	25.2	25.8	1	human B7-H4 ECD.pro
	2	377.0	■	11.7	12.1	13.1	10.3	11.0	13.7	9.7	8.4	2	human MOG1.pro
	3	229.0	426.0	■	19.2	27.8	21.5	20.1	18.2	18.1	13.8	3	human B7-H1.pro
	4	229.0	414.0	255.0	■	21.2	20.8	17.7	21.4	18.2	13.4	4	human B7-H2.pro
	5	190.5	377.0	174.9	231.0	■	25.6	19.5	23.4	24.1	20.1	5	human B7-H3.pro
	6	228.0	498.0	229.0	236.0	192.5	■	42.3	45.8	34.8	15.0	6	human BTN1A1.pro
	7	238.0	461.0	244.0	279.0	253.0	103.0	■	41.0	33.6	15.8	7	human BTN2A1.pro
	8	194.4	362.0	270.0	229.0	209.0	91.9	107.6	■	32.5	17.5	8	human BTN3A2.pro
	9	196.4	538.0	271.0	270.0	203.0	133.7	139.3	145.3	■	11.8	9	human BTNL3.pro
	10	191.3	661.0	360.0	368.0	245.0	330.0	311.0	282.0	426.0	■	10	human HHLA2.pro
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

**[0503]** Пять иллюстративных антител на измеряемом уровне не связывались с гомологами huB7-H1, huB7-H2, huB7-H3, huBTN1A1, huHHLA2 или huBTN3A2 независимо от изотипа антитела. Следует отметить, что связывание также не наблюдалось при тестировании антигенов huMOG1, huBTN2A1 или huBTNL3 (см. фигуру 3).

Анализ связывания с помощью вестерн-блота в отношении поверхности клеток

**[0504]** Открепление клеток от поверхности колб T175 осуществляли с использованием аккутазы и подсчитывали. Применяемый способ трансфекции фактически представлял собой таковой, который указан в протоколе Invitrogen Lipofectamine LTX (протокол, обеспечивающий высокую продуктивность, в котором применяется способ обратной трансфекции). 100 мкл клеток ( $4,5 \times 10^4$  на 100 мкл) добавляли в 96-луночные планшеты, содержащие смесь ДНК и липофектамина. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 18 часов и фиксировали с применением 10% забуференного формалина в течение ночи. Планшеты подвергали блокированию с помощью блокирующего буфера Odyssey, инкубировали с подходящими первичными антителами в течение ночи с последующим промыванием и выявлением с помощью подходящего вторичного антитела Odyssey.

**[0505]** Планшеты высушивали на воздухе и сканировали с применением устройства для визуализации Odyssey с применением рекомендуемых уровней сканирования, предоставленных изготовителем.

**[0506]** У QD-E02 и PQ-E02 наблюдаются высокие уровни неспецифического связывания, вследствие чего антитела неожиданно связывают широкий спектр типов клеток в такой степени, которая превосходит таковой, наблюдаемый для контрольных антител (дорожки E, U, R, S) – см. фигуру 4. OB-F05 и O5-E07 обеспечивают хорошие результаты с трансфицированными НЕК, а также связываются с трансфицированными

СНО. Иллюстративные антитела QD-E02, OB-F05, и O5-E07, и PQ-E02 связываются с клетками OVCAR4.

### ОБОБЩЕНИЕ

[0507] В таблице 14 показаны обобщенные сведения касательно свойств пяти иллюстративных антител.

Таблица 14.

Антитело	Белок	KD согласно Octet (нМ)	Эпитопная группа	ZAP		
				Клетка	IC50 (М)	Жизнеспособность, %
ZY0EPQ-E02	В7-Н4 человека	26	1	Клетка	IC50 (М)	Жизнеспособность, %
	В7-Н4 мыши	396		SKBR3	$4 \cdot 10^{-9}$	65
	В7-Н4-SV	1660		OVCAR 4	$2 \cdot 10^{-8}$	46
ZY0EQD-E02	В7-Н4 человека	14	1	Клетка	IC50 (М)	Жизнеспособность, %
	В7-Н4 мыши	621		SKBR3	$1 \cdot 10^{-8}$	48
	В7-Н4-SV	801		OVCAR 4	$2 \cdot 10^{-8}$	40
ZY0EOB-F05	В7-Н4 человека	13	2	Клетка	IC50 (М)	Жизнеспособность, %
	В7-Н4 мыши	25		SKBR3	$4 \cdot 10^{-18}$	84
	В7-Н4-SV	174		OVCAR 4	$3 \cdot 10^{-17}$	67
ZY0E05-E07	В7-Н4 человека	20	1	Клетка	IC50 (М)	Жизнеспособность, %
	В7-Н4 мыши	30		SKBR3	$2 \cdot 10^{-16}$	79
	В7-Н4-SV	264		OVCAR 4	$7 \cdot 10^{-17}$	58
ZY0EP0-C07	В7-Н4 человека	9	3	Клетка	IC50 (М)	Жизнеспособность, %
	В7-Н4 мыши	11		SKBR3	$4 \cdot 10^{-9}$	72
	В7-Н4-SV	Связывание отсутствует		OVCAR 4	$1 \cdot 10^{-8}$	57

## ПРИМЕР 4

Скрининг линий клеток в отношении экспрессии B7-H4 на поверхности с помощью проточной цитометрии

**[0508]** Следующие линии клеток человека при тестировании оказались положительными в отношении экспрессии B7-H4 с применением иллюстративных антител и/или коммерческих антител к B7-H4 (относительные уровни экспрессии B7-H4 указаны '+'):

- SK-BR-3 (+++),
- T47D (+),
- MDA-MB-468 (++)
- OVCAR4 (+++),
- NIH:OVCAR3 (+),
- Calu-3 (+).

**[0509]** Следующие линии клеток человека при тестировании оказались отрицательными: NCI-H322, Raji (+/- активация IFN $\gamma$ ), Ramos (+/- активация IFN $\gamma$ ) и Du145.

## ПРИМЕР 5

Анализ цитотоксичности *in vitro*

**[0510]** Поглощение пяти иллюстративных антител, представляющих собой IgG1-ТМ человека, линиями клеток, экспрессирующими B7-H4, было экспериментально подтверждено (SK-BR-3, MDA-MB-468, OVCAR4 и F1-B7H4 CHO JumpIn). Цитотоксичность ADC была продемонстрирована для пяти иллюстративных антител IgG1-ТМ с применением конъюгированного с сапорином вторичного антитела к IgG человека (см. фигуру 5). Жизнеспособность клеток при 20 мкг/мл контроля, представлявшего собой 'антитело отдельно', составляла около 100%.

## ПРИМЕР 6

Специфичность клона ZY0EQD\_E02 согласно ELISA

**[0511]** Вследствие превосходных функциональных характеристик клона ZY0EQD\_E02 данный клон отбирали для более подробного анализа. ZY0EQD\_E02 содержит CHDR1 под SEQ ID NO: 7; CHDR2 под SEQ ID NO: 8; CHDR3 под SEQ ID NO: 9; CLDR1 под SEQ ID NO: 10; CLDR1 под SEQ ID NO: 11; CLDR1 под SEQ ID NO: 12. Указанный клон содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 33 и VL-цепь под SEQ ID NO: 34. Указанный клон содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 48 и легкую цепь под SEQ ID NO: 44. Полученная путем обратной мутации к зародышевому типу версия (E02-GL)

содержит VH-цепь под SEQ ID NO: 45 и VL-цепь под SEQ ID NO: 34; например тяжелую цепь под SEQ ID NO: 51 и легкую цепь под SEQ ID NO: 44.

**[0512]** Проводили анализ ELISA для определения связывания с B7-H4 человека (в том числе сплайс-вариантом), яванского макака (супо), мыши и крысы. Процент идентичности последовательности B7-H4 человека с таковым у указанных видов составляет: домен FL – яванского макака (98,6%); кролика (91,6%); мыши (87,9%); крысы (86,9%); домен ECD – яванского макака (99,6%); кролика (94,3%); мыши (90%); крысы (89,6%).

**[0513]** mAb в формате Maia (например, содержащие вставку C, показанную, например, в SEQ ID NO.: 41) клона тестировали в отношении связывания. Анализировали вариант дикого типа, а также ряд вариантов (полученный путем обратной мутации к зародышевому типу (GL), GLQ, GLY) вместе с R347-maia, представляющим собой IgG1 человека, в качестве контроля (см. фиг. 6).

**[0514]** Изотипический контроль R347-maia не показал связывания с каким-либо протестированным антигеном. Профиль связывания E02-maia был сходным с таковыми в предыдущих экспериментах. E02-maia и E02-GL-maia характеризовались сходными профилями связывания. Это успешно демонстрирует, что как полученные путем обратной мутации к зародышевому типу (GL), так и не подвергнутые обратной мутации к зародышевому типу (например, дикого типа) версии антитела сохраняют преимущественные свойства/профили связывания антитела.

#### ПРИМЕР 7

##### Сравнение связывания E02-GL с mAb "1D11"

**[0515]** Аффинность связывания клона ZY0EQD\_E02, полученного путем обратной мутации к зародышевому типу (обозначаемого в данном документе E02-GL), непосредственно сравнивали с таковой известного антитела к B7-H4 "1D11" (Genentech; описано в WO2016040724, который включен в данный документ посредством ссылки) с помощью ELISA (см. материалы и способы выше).

**[0516]** Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу). Например, E02-GL в этих примерах содержит последовательность VH-цепи под SEQ ID NO: 45, например, версию, полученную путем обратной мутации к зародышевому типу, под SEQ ID NO: 43.

**[0517]** Непосредственное сравнение демонстрирует, что клон E02-GL демонстрирует значительно лучшее связывание (аффинность), чем 1D11 (см. фигуру 7). В

соответствии с примером 7 изотипический контроль R347-*maia* не показал связывания с каким-либо протестированным антигеном.

**[0518]** Кроме того, было показано (посредством экспериментов с использованием проточной цитометрии, см. материалы и способы выше), что E02-GL характеризуется превосходным связыванием с B7-H4, экспрессируемым на раковых клетках, по сравнению с 1D11. Таким образом, E02-GL не только показывает превосходное связывание, но также превосходное нацеливание на раковые клетки. Тестировали связывание как с hB7-H4-экспрессирующими клетками HT29, так и с клетками SK-BR-3 (которые экспрессируют B7-H4). Тестировали связывание антитела при концентрациях, составляющих 31 нг/мл, 156 нг/мл и 78 нг/мл. Результаты для клеток HT29 показаны на фигуре 8А, а результаты для клеток SK-BR-3 показаны на фигуре 8В. Символ  $\diamond$  обозначает 'фракцию E02-GL', а символ  $\square$  обозначает 'фракцию 1D11'. Символ "●" обозначает 'фракцию R347', представляющую собой (отрицательный) контроль.

**[0519]** Как можно видеть на фигурах 8А – 8В, количество окрашенных клеток в 'фракции E02-GL' было значительно более высоким, чем количество окрашенных клеток в 'фракции 1D11'.

#### ПРИМЕР 8

Цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток Ad293 с трансфекцией посредством B7-H4 (E02-GL-SG3932) и без таковой

**[0520]** Клон E02-GL конъюгировали с полезной нагрузкой, представляющей собой ингибитор топоизомеразы I SG3932, при среднем соотношении лекарственного средства и антитела (DAR), составляющем 8 (с получением E02-GL-SG3932), и проводили тест в отношении способности целенаправленно взаимодействовать как с трансфицированными, так и с не трансфицированными посредством B7-H4 человека клетками Ad293 (например, последние представляют собой отрицательный контроль) и уничтожать их. Антитело NIP228, конъюгированное с SG3932, применяли в качестве контроля. Конъюгат E02-GL-SG3932 без каких-либо осложнений целенаправленно взаимодействовал с трансфицированными клетками и уничтожал их, при этом он характеризовался IC50, составляющим 53,3 нг/мл (см. фигуру 9А). В нетрансфицированных клетках не наблюдали значимого уровня уничтожения после добавления конъюгата E02-GL-SG3932 (см. фигуру 9В). Во всех экспериментах, описанных в данном документе, в которых задействован E02-GL, конъюгированный с ингибитором топоизомеразы, обычно применяемые клоны E02-GL содержали последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO.: 51.

#### СПОСОБ

**[0521]** Открепление линий клеток от поверхности колб для культивирования тканей осуществляли с помощью TrypLE Express (Gibco, Пейсли, Великобритания), осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в средах для выращивания (RPMI-1640, 10% FBS). Жизнеспособные клетки подсчитывали на основе вытеснения трипанового синего с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-CELL XR (Beckman Coulter Life Sciences, Индианаполис, Индиана). Значения плотности клеток регулировали до  $3,33 \times 10^4$  клеток/мл в средах для выращивания. 75 мкл/лунка суспензии клеток ( $2,5 \times 10^3$  клеток) добавляли в 96-луночный белостенные обработанные планшеты для культивирования тканей с прозрачным дном и культивировали в течение ночи в увлажненном инкубаторе для культивирования тканей при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

**[0522]** ADC (например, NIP228-SG3932 и E02-GL-SG3932) разбавляли в средах для выращивания (RPMI-1640, 10% FBS) при концентрации 240 мкг/мл. Получали пятикратные последовательные разбавления в средах для выращивания (RPMI-1640, 10% FBS), а затем 25 мкл добавляли в лунки с культивируемыми клетками в трех повторностях с пятикратным последовательным разбавлением антитела с девятью точками (например, NIP228-SG3932 или E02-GL-SG3932). К контрольным клеткам, подвергнутым имитационной обработке, добавляли среды для выращивания в количестве 25 мкл/лунка (RPMI-1640, 10% FBS). Клетки культивировали в увлажненном инкубаторе для культивирования тканей при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение шести дней, по истечению которых жизнеспособность клеток оценивали с применением анализа CellTiter-Glo® (Promega, Саутгемптон, Великобритания) в соответствии с протоколом изготовителя. Люминесценцию измеряли с применением многоканального планшет-ридера Envision (Perkin Elmer, Сир-Грин, Великобритания). Эффективность антител (например, NIP228-SG3932 или E02-GL-SG3932) испытываемого образца определяли путем генерирования значений полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) с применением нелинейной регрессионной модели [log зависимости ответа от агониста – переменный угловой коэффициент (четыре параметра)] в GraphPad Prism, версии 8 (программное обеспечение GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния) и представляли в виде жизнеспособности клеток в процентах относительно контрольных клеток, подвергнутых имитационной обработке:  $\frac{[(\text{обработанные клетки} - \text{фоновый уровень}) / (\text{контрольные клетки}, \text{ подвергнутые имитационной обработке} - \text{фоновый уровень})]}{100}$ .

#### ПРИМЕР 9

E02-GL-SG3932 вызывает неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vitro*

**[0523]** Положительные по мишени клетки HT29-huV7-H4-клон-26 и GFP-меченные отрицательные по мишени клетки HT29 высевали в планшет либо по отдельности, либо в

виде смеси в соотношении 1:1 и культивировали в течение 1 дня, обрабатывали с помощью 200 нг/мл E02-GL-SG3932 или изотипического контроля ADC NIP228-SG3932 в течение 6 дней. В конце обработки определяли количество живых GFP-отрицательных клеток HT29-huB7-H4-клон-26 или GFP-положительных клеток HT29 с применением проточной цитометрии. Результаты показаны на фигуре 10. А) Точечные диаграммы показывают иллюстративные изображения из анализов методом проточной цитометрии в конце обработки для обработанных средами образцов клеток HT29-GFP и HT29+huB7-H4-клон-26, культивируемых по отдельности или вместе. Цифры, показанные в верхнем левом и нижнем левом квадрантах, отражают процентное значение для клеток HT29-GFP и HT29+huB7-H4-клон-26 соответственно. В) При высевании в планшет по отдельности наблюдали уменьшение количества клеток после обработки с помощью E02-GL-SG3932 среди клеток HT29+huB7H4-клон-26, что не наблюдалось среди отрицательных по мишени клеток HT29-GFP. При высевании клеток в планшет в виде совместной культуры количества клеток как в случае отрицательных по мишени клеток HT29-GFP, так и в случае положительных по мишени клеток HT29+huB7H4-клон-26 были снижены, что демонстрирует эффект неспецифического цитолиза.

#### СПОСОБ

**[0524]** Применяли систему экспрессии на основе лентивируса для получения линии клеток HT29-GFP, которая стабильно экспрессирует зеленый флуоресцентный белок (GFP). Клетки высевали при общей плотности клеток, составляющей 15000 клеток на лунку, в 24-луночные планшеты, культивировали по отдельности или в виде смеси при соотношении 1:1 и культивировали в течение 1 дня. Затем среды удаляли и заменяли свежими средами отдельно или средами, содержащими 200 нг/мл ADC NIP228-SG3932 или E02-GL-SG3932, и клетки инкубировали в течение дополнительных 6 дней. В конце обработки определяли количество живых GFP-отрицательных клеток HT29+huB7-H4-клон-26 или GFP-положительных клеток HT29 с применением проточной цитометрии и программного обеспечения FlowJo.

#### ПРИМЕР 10

E02-GL-SG3932 вызывает неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vivo*

**[0525]** Опухолевые клетки подкожно имплантировали самкам мышей SCID возрастом от 8 до 10 недель. Когда опухоли достигали подходящего диапазона объема опухоли (как правило, 150-250 мм<sup>3</sup>), животных рандомизировали на группы обработки и контроля и начинали введение доз. Несущим опухоль мышам вводили одну дозу тестируемого образца с помощью внутривенной инъекции. Животных осматривали ежедневно, и размеры опухоли и веса тела измеряли и регистрировали два-три раза в

неделю. Результаты показаны на фигуре 11. Величины опухоли измеряли посредством штангенциркуля и объемы опухолей рассчитывали с применением следующей формулы: объем опухоли = длина (мм) x ширина (мм)<sup>2</sup>/2, где длина и ширина представляют собой наиболее длинный и наиболее короткий диаметры опухоли соответственно.

#### ПРИМЕР 11

E02-GL-SG3932 обладает сильной активностью *in vivo* в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата (PDX)

**[0526]** Фрагменты ткани опухоли подкожно имплантировали самкам "голых" бестимусных мышей возрастом от 6 до 8 недель. Когда опухоли достигали подходящего диапазона объема опухоли (как правило, 150-300 мм<sup>3</sup>), животных рандомизировали на группы обработки и контроля и начинали введение доз. Несущим опухоль мышам вводили одну дозу тестируемого образца с помощью внутривенной инъекции. Животных осматривали ежедневно и размеры опухоли и вес тела измеряли и регистрировали два раза в неделю. Результаты показаны на фигуре 12 и демонстрируют, что E02-GL-SG3932 обладает сильной активностью *in vivo* в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата (PDX). Величины опухоли измеряли посредством цифрового штангенциркуля и объемы опухолей рассчитывали с применением следующей формулы: объем опухоли = длина (мм) x ширина (мм)<sup>2</sup> x 0,52, где длина и ширина представляют собой самый длинный и самый короткий диаметры опухоли соответственно.

**[0527]** На фигуре 13 показаны результаты дополнительной оценки противоопухолевого ответа *in vivo* на E02-GL-SG3932 путем определения изменений объема опухоли после обработки, которые снова продемонстрировали противоопухолевую активность E02-GL-SG3932 в PDX-моделях после одной внутривенной инъекции. Объем опухоли в начале обработки называется исходным объемом опухоли (ITV); объем опухоли во время демонстрации максимального ответа на обработку с помощью ADC называется конечным объемом опухоли (ETV). Если ETV является меньшим, чем ITV, то противоопухолевый ответ рассчитывается следующим образом: [(ETV-ITV)/ITV] x 100. В противном случае противоопухолевый ответ выражается в виде изменения объема опухоли в процентах в группе обработки относительно группы контроля, представляющего собой среду-носитель: 100-[1-((ETV-ITV)средство обработки/(ETV-ITV)среда-носитель) x 100].

## Пример 12

ADC, представляющий собой E02-GL-ингибитор топоизомеразы I, обладает сходной эффективностью в моделях, полученных на основе клеток MX-1 и HT29, *in vitro* и *in vivo*

## Модель на основе MX-1

**[0528]** Модель на основе ксенотрансплантата из MX-1 получали в Crown Biosciences (Тайван, Китай). Исследование проводили в соответствии с руководствами и CRO, и IACUC AstraZeneca. Опухолевые клетки MX-1 поддерживали *in vitro* в среде RPMI-1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Экспоненциально растущие клетки собирали и  $5 \times 10^6$  клеток (в смеси PBS:матригель = 1:1 объемом 0,1 мл) имплантировали самкам "голых" мышей BALB/c в правый бок. Непосредственно перед началом обработки мышей рандомизировали на группы обработки (средний объем опухоли = 153 мм<sup>3</sup>) с применением способа рандомизации "Matched distribution" (программное обеспечение Study Director™). Все конъюгаты антитела и лекарственного средства разбавляли в буфере (25 мМ гистидина, 7% сахарозы, 0,02% PS80, pH 6,0) непосредственно перед введением. ADC вводили в виде одной внутривенной дозы. Измерения опухоли и веса тела регистрировали дважды в неделю и объем опухоли рассчитывали с применением уравнения: длина (мм) x ширина (мм)<sup>2</sup>/2. Животных проверяли ежедневно в отношении возникновения заболевания и наступления смертельного исхода. Результаты показаны на фигуре 14A.

## HT29+huB7-N4 (клон 4)

**[0529]** Линию клеток HT29+huB7-N4-клон-4 поддерживали *in vitro* в модифицированной по Мак-Кою среде 5A, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Экспоненциально растущие клетки HT29+B7-N4-клон-4 собирали и  $5 \times 10^6$  клеток (в 0,2-мл объеме PBS:Cultrex = 1:1) имплантировали самкам мышей SCID CB-17 в правый бок. Мышей рандомизировали на группы обработки непосредственно перед обработкой (средний объем опухоли = 250 мм<sup>3</sup>) с применением способа рандомизации "Deterministic" (программное обеспечение Study Director™). Все конъюгаты антитела и лекарственного средства разбавляли в буфере (25 мМ гистидина, 7% сахарозы, 0,02% PS80, pH 6,0) непосредственно перед введением. ADC вводили внутривенно в виде одной дозы. Измерения опухоли и веса тела регистрировали дважды в неделю и объем опухоли рассчитывали с применением уравнения: длина (мм) x ширина (мм)<sup>2</sup>/2. Животных проверяли ежедневно в отношении возникновения заболевания и наступления смертельного исхода. Результаты показаны на фигуре 14B.

## ПРИМЕР 13

Цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток, трансфицированных с помощью В7-Н4 яванского макака (E02-GL-SG3249)

**[0530]** Клон E02-GL конъюгировали с цитотоксином SG3249 (с получением E02-GL-SG3249) и тестировали в отношении способности целенаправленно взаимодействовать как с клетками, трансфицированными с помощью В7-Н4 яванского макака, так и с клетками, не трансфицированными с помощью В7-Н4, и уничтожать их. Для удобства тестируемое в данном примере антитело содержало остов тяжелой цепи Maia (например, содержащий вставку цистеина, обеспечивающую получение дополнительного участка, с которым можно конъюгировать SG3249, см. SEQ ID NO: 48). Не возникало потери эффективности, когда применяли другие остовы тяжелой цепи (например, без такой вставки цистеина, например, см. SEQ ID NO: 52). Антитело R347, конъюгированное с SG3249, применяли в качестве контроля.

**[0531]** Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу). Например, E02-GL в этих примерах содержит последовательность VH-цепи под SEQ ID NO: 45, например версию, полученную путем обратной мутации к зародышевому типу, под SEQ ID NO: 43.

**[0532]** Конъюгат E02-GL-SG3249 без каких-либо осложнений целенаправленно взаимодействовал с трансфицированными клетками и уничтожал их, при этом он характеризовался IC50, составляющим 0,6721 нг/мл. В нетрансфицированных клетках не наблюдали значимого уничтожения после добавления конъюгата E02-GL-SG3249 (см. фигуру 15).

## ПРИМЕР 14

## Механизм действия E02-GL

Наблюдение кинетических параметров поглощения E02-GL живыми клетками

**[0533]** Для обработки живых клеток применяли E02-GL, конъюгированный с флуоресцентным маркером AF647. Через 0 мин после обработки отмечали кластеры флуоресценции на клеточных мембранах (что указывает на связывание с В7-Н4, присутствующим на мембране). Анализ во временной динамике показал, что количество флуоресцентных зон внутри клеток устойчиво повышалось со временем, что указывало на поглощение антитела вместе с антигеном рецептора. Совместная визуализация с Lamp1-AF488 (маркером лизосом) показала значительное перекрытие, что указывает на то, что связанное антитело поглощается путем эндоцитоза (см. фигуру 16А – 16С).

**[0534]** Наблюдаемое поглощение антитела после связывания с антигеном-мишенью является очень перспективным, поскольку такое поглощение в общем считается предусловием достижения требуемого эффекта от ADC.

**[0535]** Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу). Например, E02-GL в этих примерах содержит последовательность VH-цепи под SEQ ID NO: 45, например, версию, полученную путем обратной мутации к зародышевому типу, под SEQ ID NO: 43.

ADC E02-GL-SG3932: механизм действия

**[0536]** После обработки клеток HT29+huB7-H4-клон-26 с помощью NIP228, E02-GL, NIP228-SG3932, E02-GL-SG3932 или поражающего элемента SG3924 в качестве контроля (10 мкг/мл для mAb или ADC и 10 нМ для поражающего элемента) получали лизат и подвергали его анализу методом вестерн-блот с антителами к pATR, ATR, pChk1, Chk1, pATM, ATM, pChk2, Chk2, pH2AX, H2AX и актину (контроль нагрузки) — см. фигуру 17А. Результаты демонстрируют, что поражающий элемент E02-GL-SG3932, представляющий собой ингибитор топоизомеразы I (SG3924), активирует передачу сигнала ATM и ATR, что указывает на то, что обработка с помощью E02-GL-SG3932 приводит к двухнитевым разрывам ДНК *in vitro*.

**[0537]** После обработки клеток MX-1 с помощью NIP228, E02-GL, NIP228-SG3932, E02-GL-SG3932 или поражающего элемента SG3924 в качестве контроля (10 мкг/мл для mAb или ADC и 10 нМ для поражающего элемента) получали лизат и подвергали его анализу методом вестерн-блот с антителами к pATR, ATR, pATM, ATM, pH2AX, H2AX и актину (контроль нагрузки) – см. фигуру 17В. Результаты демонстрируют, что поражающий элемент E02-GL-SG3932, представляющий собой ингибитор топоизомеразы I (SG3924), активирует передачу сигнала ATM и ATR, что указывает на то, что обработка с помощью E02-GL-SG3932 приводит к двухнитевым разрывам ДНК *in vitro*.

#### СПОСОБ

**[0538]** Клетки HT29+huB7-H4-клон-26 и MX-1 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 500000 и 1500000 клеток на лунку соответственно в среде, содержащей 10% инактивированной теплом FBS. На следующий день среду, использованную при высевании, удаляли и клетки подвергали инкубации: клетки HT29+huB7-H4-клон-26 с NIP228, E02-GL, NIP228-SG3932 и E02-GL-SG3932 в полной среде при концентрации 10 мкг/мл. Поражающий элемент SG3924 применяли при 10 нМ в качестве контроля. Через 72 часа клетки один раз промывали забуференным фосфатом солевым раствором (PBS), а затем лизировали путем добавления буфера Laemmil Reducing (загрузочный

буфер от Boston BioProducts). После короткой инкубации клеточные лизаты собирали, равные количества загружали на гели Bis NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen) и белки переносили на поливинилиденфторидные (PVDF) мембраны (Invitrogen). Мембраны подвергали блокированию с помощью 5% нежирного сухого молока и 0,1% Tween 20 (Sigma) в Tris-забуференном солевом растворе, pH 7,4 (TBST), и инкубировали в течение ночи при 4°C с антителами от Cell Signaling к pATM-Ser1981 (№ 4526), ATM (№ 2873), pATR-Thr1989 (№ 58014), ATR (№ 13934), pChk1-Ser345 (№ 2348), Chk1 (№ 2360), pChk2-Thr68 (№ 2197), Chk2 (№ 3440), pH2AX-Ser139 (№ 2577) и H2AX (№ 2595). Антитело к актину (A1978, Sigma) применяли для того, чтобы удостовериться, что во все лунки загружали равное количество белка. Мембраны промывали в 0,1% Tween 20 в TBS, а затем инкубировали в течение 1 часа с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) стрептавидиновыми вторичными антителами (GE Healthcare). После промывания полосы белка выявляли путем применения хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Femto и хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico (Pierce/Thermo Scientific). Для захвата и анализа изображений применяли прибор ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

#### ADC E02-GL-SG3249: механизм действия

**[0539]** После обработки клеток HCC1569 с помощью E02-GL-SG3249 и SG3199 в качестве контроля (при 100 нг/мл и 100 пМ соответственно) получали лизаты и их подвергали анализу методом вестерн-блота с антителами к pATR, ATR, pChk1, Chk1, pRPA32, RPA32, pATM, ATM (все из которых задействованы в передаче сигнала ATR), pChk2, Chk2, pKAP1, KAP1 (все из которых задействованы в передаче сигнала ATM), pDNA-ПК, DNA-ПК, pH2AX, H2AX, pBRCA1, BRCA1 (все из которых задействованы при двухнитевых разрывах ДНК), pFANCD2 и GAPDH (контроль загрузки). Отрицательные контрольные образцы представляли собой таковые с обработкой с помощью только PBS.

**[0540]** Результаты демонстрируют, что поражающий элемент E02-GL-SG3249, представляющий собой димер PBD (SG3199), активирует передачу сигнала ATM и ATR, что указывает на то, что обработка с помощью E02-GL-SG3249 приводит к двухнитевым разрывам ДНК *in vitro* (см. фигуру 17С).

#### Активность каспазы 3/7

**[0541]** Клетки KBR-3 обрабатывали с помощью E02-GL-SG3249, SG3199 и олапариба (контроль) и осуществляли мониторинг в отношении активности каспазы 3/7 (например, апоптоз) с помощью IncuCyte. Наблюдали дозозависимое повышение уровня активности каспазы 3/7 (см. фигуру 18).

## ПРИМЕР 15

Активность *in vitro* E02-GL-SG3249 и поражающего элемента SG3199 в опухолевых клетках

**[0542]** Ряд линий клеток рака обрабатывали клоном E02-GL-SG3249 (например, конъюгированным с цитотоксином), как указано в таблице 15. Результаты показаны на фигуре 19.

Таблица 15.

Линия клеток	КОММЕНТАРИИ	E02-GL, MESF
HT29	Отрицательная по B7-H4	2101
HT29-hB7H4-клон-4		71928
HT29-hB7H4-клон-44		147125
HT29-hB7H4-клон-26		429398
Исходная НЕК293 JI	Отрицательная по B7-H4	3266
Пул НЕК293 JI-hB7H4	В пуле присутствует немного отрицательных клеток	2481266
HCC1954		47173
SKBr3		78343
Zr75-1		80699
HCC1569		112608
MDA-MB-468		92157
OVCAR4		261997

## ПРИМЕР 16

E02-GL-SG3249 вызывает неспецифический цитоллиз опухолевых клеток *in vitro*

**[0543]** Клетки HT29, экспрессирующие B7-H4, обрабатывали с помощью E02-GL-SG3249 в течение 4 дней, после которых кондиционированную среду удаляли и добавляли к HT29 дикого типа (т. е. не экспрессирующим B7-H4). После добавления кондиционированной среды наблюдали быстрое уменьшение жизнеспособности клеток, что не наблюдалось в необработанном контроле (см. фигуру 20).

**[0544]** Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

## ПРИМЕР 17

E02-GL-SG3249 подавляет рост ксенотрансплантатов, представляющих собой опухоли

**[0545]** У мышей получали ксенотрансплантаты, представляющие собой опухоли, с применением следующих линий клеток рака:

- OVCAR4 (невосприимчивый к цисплатину рак яичника; высокий уровень экспрессии B7-H4);
- HCC1569 (HER2-положительный рак молочной железы; неоднородная экспрессия B7-H4);
- MDA-MB-468 (трижды отрицательный рак молочной железы; низкий уровень экспрессии B7-H4).

**[0546]** Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0547]** Наблюдали значительное уменьшение объема опухоли по сравнению с контролем (только среда-носитель), что неожиданно также наблюдалось в случае опухолей TNBC с низким уровнем экспрессии B7-H4 (см. фигуру 22), указывая на высокую эффективность E02-GL-SG3249 в подавлении роста опухолей.

## ПРИМЕР 18

E02-GL-SG3249 вызывает неспецифический цитолиз опухолевых клеток *in vivo*

**[0548]** Получали неоднородные по B7-H4 опухоли путем совместного имплантирования линий клеток HT29, экспрессирующих B7-H4, с клетками HT29, не экспрессирующими B7-H4 (соотношение 1:1). Неоднородная природа этих ксенотрансплантатов не предотвращала подавления их роста с помощью E02-GL-SG3249, которое было резко выраженным (см. фигуру 23). Это является очень перспективным, поскольку авторы настоящего изобретения обнаружили, что B7-H4 в пределах опухолей экспрессируется неоднородно.

## ПРИМЕР 19

ADC на основе E02-GL обладает превосходной цитотоксичностью *in vitro* в отношении клеток, экспрессирующих B7-H4, по сравнению с "1D11"

**[0549]** Клон E02-GL (полученный путем обратной мутации к зародышевому типу (GL) ZY0EQD\_E02) конъюгировали с цитотоксином SG3249 (с получением ADC E02-GL-SG3249) или с AZ1508 (с получением E02-GL-AZ1508) и сравнивали с ADC на основе "1D11" от Genentech (1D11, конъюгированный с MMAE (A114C-)) по способности целенаправленно взаимодействовать с клетками, экспрессирующими B7-H4, и уничтожать их.

**[0550]** Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0551]** Анализы цитотоксичности (см. материалы и способы выше) продемонстрировали, что ADC на основе E02-GL (E02-GL-SG3249) обладает превосходной цитотоксической эффективностью по сравнению с ADC на основе 1D11 (1D11, конъюгированный с MMAE (A114C-)) – см. фигуру 21.

**[0552]** Титры ADC были следующими.

1D11- A114C- MMAE	100 м кг/мл	25 мк г/мл	6,25 мкг/м л	1,56 мкг/м л	390 н г/мл	98 нг/ мл	24,5 нг/мл	6,12 нг/мл	1,53 нг/мл	382 п г/мл
E02-maia- GL- SG3249	4 мкг/ мл	1 мкг /мл	250 н г/мл	65 нг/ мл	16 нг/ мл	4 нг/ мл	1 мкг /мл	250 п г/мл	62,5 пг/мл	16 пг/ мл

ПРИМЕР 20

E02-GL-SG3249 обладает сильной активностью *in vivo* в моделях на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата (PDX)

**[0553]** Модели на основе полученного из организма пациента ксенотрансплантата получали с применением линий клеток рака с различающимися уровнями экспрессии B7-H4, как указано в таблице 16. Подавление роста опухолей наблюдали во всех моделях (см. фигуру 24). Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

Таблица 16.

Модель	Тип рака	% подавления роста опухоли (TGI) *
HBCx-10	Молочной железы (трижды отрицательный)	90
CTG-012	Молочной железы (трижды отрицательный)	90
HBCx-11	Молочной железы (трижды отрицательный)	80
T330	Молочной железы (трижды отрицательный)	70

HBCx-9	Молочной железы (трижды отрицательный)	70
T168	Молочной железы (HR+)	60
T272	Молочной железы (HR+)	30
CTG-1106	Молочной железы (трижды отрицательный)	30
CTG-052	Молочной железы (трижды отрицательный)	30
CTG-1086	Яичника	20
CTG-1153	Молочной железы (трижды отрицательный)	<10
CTG-0897	Яичника	<10
CTG-017	Молочной железы (трижды отрицательный)	<10
T226	Молочной железы (Her2+)	<10
CTG-0992	Яичника	0

\* % подавления роста опухоли (TGI) 0,3 мг/кг при сравнении E02-GL-SG3249 со средой-носителем; среднее значение по методу наименьших квадратов (LSM) и  $TGI = 100 * (LSM \text{ среды-носителя} - LSM \text{ 'E02-GL-SG3249'}) / LSM \text{ среды-носителя}$

+++ = в высокой степени положительная экспрессия; ++ и + = в низкой степени положительная экспрессия

#### ПРИМЕР 21

E02-GL-SG3249 вызывает двухнитевые разрывы в ксенотрансплантатах, представляющих собой опухоли

**[0554]** Модели на основе ксенотрансплантатов, представляющих собой опухоли, получали (с применением клеток HCC1954) и обрабатывали с помощью E02-GL-SG3249. Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0555]** Затем проводили иммуногистохимическое исследование с выявлением гамма-H2AX (маркер двухнитевых разрывов) после обработки. Повышенные количества

гамма-H2AX-положительных опухолевых клеток наблюдали вплоть до 10 дней после обработки с помощью E02-GL-SG3249 (см. фигуру 25).

#### ПРИМЕР 22

Анализ аффинности E02\_GL с применением KinExA 3200

**[0556]** Эксперименты для получения оценочных значений аффинности (KD) Fab к B7H4 клона E02\_GL к B7H4 человека проводили с применением технологии KinExA. Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0557]** Ряд концентраций B7H4 человека уравнивали в течение ночи в присутствии 5, 10 или 45 нМ фиксированных концентраций Fab при 25°C. Их анализировали на KinExA 3200 и наборы данных подвергали глобальной аппроксимации (анализ N-кривой). Результаты обобщены в таблице 17.

Таблица 17.

Антитело	B7H4	Наилучшее оценочное значение KD	Анализ N-кривой, комментарии
E02_GL	Человека	1,2 нМ	KD = 1,21 нМ с 95% доверительным интервалом = 0,556-2,22 нМ. 62% hB7H4 эпитопно активны, 95% доверительный интервал = 51-77%

**[0558]** Численное значение активности hB7H4, составляющее 62%, четко совпадает с расчетами Rmax при сопутствующих оценках аффинности E02\_GL на основе Biacore.

#### ПРИМЕР 23

Сравнение связывания с B7-H4 E02\_GL и mAb "1D11"

**[0559]** Клон E02\_GL подвергали ELISA-анализу в отношении связывания с B7-H4 человека и мыши. Связывание непосредственно сравнивали с таковым для mAb 1D11 (Genentech) и изотипического контроля R347. Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0560]** E02\_GL показывает более высокую аффинность связывания с B7-H4 человека по сравнению с B7-H4 мыши (см., например, фигуру 2E). E02-GL успешно показало значительно более сильное связывание (аффинность) с B7-H4 человека чем mAb "1D11" от Genentech (которое показало намного более слабое связывание), что было продемонстрировано как с помощью ELISA-анализа, так и с помощью анализа FAC – см.

фигуры 7 и 8 соответственно. В действительности mAb "1D11" от Genentech связывает B7-N4 человека на уровнях (низких), сходных с таковыми для B7-N4 мыши (показывая, что "1D11" характеризуется меньшей специфичностью в отношении белка человека по сравнению с E02\_GL).

#### ПРИМЕР 24

Исследования с визуализацией, показывающие локализацию E02\_GL в опухоли

**[0561]** Исследования с визуализацией *in vivo* проводили, как указано в разделе Материалы и способы (выше), а именно с использованием 800CW-меченного антитела (E02\_GL). Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0562]** Наблюдала преимущественную локализацию Ab к B7-N4 (E02\_GL) в опухоли, экспрессирующей B7-N4, по сравнению с опухолью дикого типа: для HT29 – в дни 3, 7, 14; для CT26 – в дни 3 и 7, и при этом  $p = 0,06$  в день 10; и для 4T1 – в день 7; см. фигуры 26 и 27.

**[0563]** Общая эффективность излучения обеспечивала наиболее четкие результаты. При нормализации по объему опухоли наблюдали сходные тенденции.

#### ПРИМЕР 25

Токсикологические исследования с использованием E02-GL-SG3249

**[0564]** E02-GL-SG3249 вводили самцам яванских макаков ( $N = 2$ /уровень дозы). Антитело "E02-GL" содержит последовательности CDR/VH ZY0EQD-E02 (например, соответствует ему) ("GL" означает, что антитело было получено путем обратной мутации к зародышевому типу).

**[0565]** Аномальные значения токсичности не наблюдались, и значения токсичности соответствовали таковым для других сходных PBD-ADC (по результатам мониторинга стандартных органов-мишеней: почки, костного мозга, кожи; свидетельства наличия связанных с мишенями эффектов отсутствуют).

#### ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**[0566]** Предпринимали фармакологические исследования *in vitro* и *in vivo* для получения дополнительных характеристик эффектов и механизма действия антитела E02-GL (антитела E02-GL и его промежуточного соединения, представляющего собой антигенсвязывающий Fab, обозначаемого в данном документе "E02-INT"). E02-GL-SG3932 ADC -GL-SG3932 представляет собой ADC, направленный на B7-N4 и состоящий из моноклонального антитела IgG1к к B7-N4 человека (т. е. E02-GL), конъюгированного посредством расщепляемой конструкции малеимид-PEG8-валин-аланиновый линкер

(расщепляемая конструкция mal-PEG8-линкер val-ala) с поражающим элементом TOP1i. Поражающий элемент TOP1i в данном документе обозначается SG3924. Лекарственное средство на основе TOP1i ковалентно связано с остатками нативного цистеина в антителе посредством тиосульфидной связи, при этом связано примерно 8 единиц лекарственного средства на антитело (т. е. DAR составляет 8). Схематическое изображение ADC E02-GL-SG3932 показано на фигуре 29А. Ключевые признаки, которые отличают ADC E02-GL-SG3932 от конкурентных ADC, показаны на фигуре 29В.

**[0567]** Характеристики E02-GL-SG3932 изложены ниже и дополнительно описаны в других местах в данном документе.

- mAb E02-INT: специфическое связывание с B7-H4 человека и яванского макака (аффинность 3,7 нМ, 3,94 нМ соответственно).
- Поражающий элемент: SG3932.
- Линкер-поражающий элемент: расщепляемая конструкция mal-PEG8-линкер val-ala-SG3932.

#### Исследования *in vitro*

##### ПРИМЕР 26

#### Определение профиля экспрессии B7-H4 с помощью иммуногистохимического исследования

**[0568]** Профиль экспрессии B7-H4 оценивали с применением валидированного протокола ИНС для демонстрации экспрессии B7-H4 в FFPE нормальных тканях яванского макака и человека и тканях опухолей человека.

**[0569]** Было показано, что B7-H4 экспрессируется в ограниченном количестве нормальных тканей человека и в случае присутствия в целом экспрессируется в <10% от общего числа клеток в образце (за исключением фаллопиевой трубы и бронха легкого), при этом ограничивается дуктальным или трубчатым эпителием и в основном локализуется на апикальной люминальной мембране (таблица 18). Сходный паттерн экспрессии B7-H4 выявляли в нормальных тканях яванского макака (таблицы 2 и 19), где было показано, что B7-H4 экспрессируется в ограниченном количестве тканей, при этом паттерн экспрессии ограничен дуктальным или трубчатым эпителием и в основном локализуется на апикальной люминальной мембране и внутри цитоплазмы.

Иллюстративные изображения, полученные в результате иммуногистохимического окрашивания в отношении B7-H4 в выбранных нормальных тканях человека и яванского макака, показаны на фигуре 30.

Таблица 18. Результаты определения экспрессии B7-H4 в нормальной ткани человека, полученные с использованием иммуногистохимического исследования

Ткань	Количество доноров, демонстрирующих ИНС окрашивание в отношении В7-Н4	Относительная доля ткани, демонстрирующей положительное окрашивание в отношении В7-Н4	Интенсивность <sup>а</sup>	Локализация в клетке	Подробности
Молочная железа	6/6	<10%	+ / +++	Люминальная т	Эпителиальные клетки протоков
Придаток яичка	3/3	<5%	++	Люминальная т	Люминальная т в протоках
Фаллопиева труба	3/3	<30%	++ / +++	Люминальная т	Окрашивание эпителия протоков
Почка	11/11	<5%	++ / +++	Люминальная т > с	Окрашивание люминальной мембраны и в некоторой степени цитоплазмы в единичных канальцах
Печень	2/3	1%	+ / ++	Люминальная т	Люминальная мембрана единичных небольших желчных протоков
Легкое – бронх	7/7	<20%	++ / +++	Люминальная т > с	Базальные клетки в бронхиальном эпителии и единичные эпителиальные клетки протоков в бронхиальных железах
Пищевод	1/3	1%	+	Люминальная т	Базолатеральная мембрана единичных эпителиальных клеток в субмукозных железах

Ткань	Количество доноров, демонстрирующих ИНС окрашивание в отношении В7-Н4	Относительная доля ткани, демонстрирующей положительное окрашивание в отношении В7-Н4	Интенсивность <sup>а</sup>	Локализация в клетке	Подробности
Яичник	3/6	1%	+ / ++	с > m	Отдельный зрелый ооцит, демонстрирующий наличие зернистых клеток
Поджелудочная железа	8/8	<5%	+ / +++	Люминальная м	Люминальная мембрана и цитоплазма centroacinarных клеток и окрашивание люминальной мембраны вставочных протоков
Гипофиз	3/3	<5%	++ / +++	m > c	Единичные локализованные клетки в пределах клеток промежуточной доли гипофиза демонстрируют окрашивание коллоидного вещества в фолликулах и эпителиальных клетках кармана Ратке
Предстательная железа	3/3	<10%	++ / +++	m > c	Базальные эпителиальные клетки в некоторых протоках

Ткань	Количество доноров, демонстрирующих ИНС окрашивание в отношении В7-Н4	Относительная доля ткани, демонстрирующей положительное окрашивание в отношении В7-Н4	Интенсивность <sup>а</sup>	Локализация в клетке	Подробности
Семенная железа	3/3	<10%	++/+++	Люминальная m	Несколько дуктулярных эпителиальных клеток
Кожа	15/16	<5%	++/+++	Люминальная m	Мембрана единичных эпителиальных клеток протоков потовых желез, мембрана эпителиальных клеток волосяного фолликула
Мочеточник	3/3	<5%	+ / ++	m > c	Окрашивание цитоплазмы в некоторых базальных уротелиальных клетках
Мочевой пузырь	8/8	<10%	++/+++	Люминальная m > c	Апикальная сторона уротелиальных клеток
Все другие ткани не продемонстрировали положительного ИНС окрашивания в отношении В7-Н4			Надпочечная железа, аорта, артерия, костный мозг, головной мозг, слепая кишка, толстая кишка, двенадцатиперстная кишка, глаз, сердце, подвздошная кишка, тощая кишка, легкое, лимфатический узел, нерв, прямая кишка, слюнная железа, скелетная мышца, спинной мозг, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, язык, влагалище		

с: цитоплазма; m: мембрана.

<sup>a</sup> Все окрашенные срезы осматривались и оценивались в баллах патоморфологом, оценивающим и долю клеток, экспрессирующих V7-N4, и интенсивность окрашивания, и локализацию окрашивания в клетке. Интенсивность приведена как слабая (+), умеренная (++) или сильная (+++).

**[0570]** Патоморфологом проводилась оценка экспрессии V7-N4 в ряде тканей опухолей человека с применением ИHC и оценка в баллах. Обобщенные сведения по экспрессии в тканях опухолей человека изложены подробно в таблице 19 с иллюстративными изображениями, показанными на фигуре 31.

Таблица 19. Результаты определения экспрессии V7-N4 в ткани опухоли человека, полученные с использованием иммуногистохимического исследования

Данные об опухоли	Доля доноров (%) с HIGH V7-N4+ опухолями <sup>a</sup>	Доля доноров (%) с LOW V7-N4+ опухолями <sup>b</sup>	Доля доноров (%) с положительными по V7-N4+ опухолями <sup>c</sup>	Общая доля доноров (%) с V7-N4+ опухолями <sup>d</sup>	Общее число доноров
Аденокарцинома эндометрия	42,4	45,5	6,1	93,9	66
Молочной железы (TNBC)	28,8	35,1	12,6	76,6	111
Молочной железы (ER+)	32,6	32,3	10,8	75,7	288
Молочной железы (HER2+)	46,7	23,3	13,3	83,3	30
Яичника (серозная папиллярная)	49,3	28,0	6,7	84,0	75
Холангиокарцинома	33,3	30,3	21,2	84,8	66
NSCLC-SCC	15,0	27,5	23,5	66,0	153

<sup>a</sup> HIGH V7-N4: образцы тканей опухолей человека, содержащие от 50% до 100% V7-N4-положительных клеток.

<sup>b</sup> LOW B7-N4: образцы тканей опухолей человека, содержащие от 5% до 49% B7-N4-положительных клеток.

<sup>c</sup> Положительные по B7-N4: образцы тканей опухолей человека, содержащие от 1% до 4% B7-N4-положительных клеток.

<sup>d</sup> Указывает долю образцов тканей опухолей человека, содержащих от 1% до 100% B7-N4-положительных клеток.

**[0571]** В данном примере продемонстрировано, что B7-N4 экспрессировался при многих типах рака человека, в том числе при раке молочной железы, холангиокарциноме, карциноме эндометрия, немелкоклеточном раке легкого, плоскоклеточной карциноме и серозной карциноме яичника.

#### ПРИМЕР 27

Сравнение гомологичности последовательностей B7-N4 человека с ее ортологами у яванского макака, макака-резуса, мыши и крысы

**[0572]** Идентифицировали аминокислотные последовательности B7-N4 человека и выравнивали с ортологами у яванского макака, макака-резуса, мыши и крысы.

Процентное значение идентичности рассчитывали на основе результатов этих процедур выравнивания. B7-N4 является довольно консервативным среди отличных от человека приматов; B7-N4 человека (hB7-N4) характеризуется идентичностью последовательности, составляющей 98% и 99%, как в случае полноразмерного белка, так и в случае областей, представляющих собой внеклеточные домены, соответственно с таковыми у яванского макака (суB7-N4) и у макака-резуса (rhB7-N4) (фигура 32). Виды грызунов являются менее консервативными; B7-N4 мыши и крысы характеризуются идентичностью последовательности с hB7-N4, составляющей 87% и 86%, в случае полноразмерного B7-N4 соответственно и идентичностью последовательности с hB7-N4, составляющей 90% и 89%, в случае внеклеточного домена соответственно.

**[0573]** В этом примере продемонстрировано, что высокое значение идентичности аминокислотных последовательностей B7-N4 между человеком и отличными от человека приматами свидетельствует о том, что E02-GL-SG3932 вероятно будет связываться с B7-N4 яванского макака и макака-резуса. Напротив, при сравнении значение идентичности аминокислот между B7-N4 человека, мыши и крысы является более низким, что указывает на то, что связывание E02-GL-SG3932 с B7-N4 мыши или крысы является менее вероятным.

## ПРИМЕР 28

Стабильность E02-GL-SG3932 после пятнадцатидневной инкубации в сыворотке крови мыши, крысы, яванского макака и человека

**[0574]** Известно, что ADC, несущие лекарственное средство, связанное с остатками цистеина посредством тиосукцинимидов, демонстрируют некоторую степень потери лекарственного средства в физиологическом окружении вследствие обратной реакции Михаэля. В этом процессе происходит восстановление цистеина, применяемого для конъюгации, и лекарственного средства, несущего малеимид, вследствие чего со временем значение DAR в ADC снижается. Этот процесс деконъюгации является известным свойством ADC, содержащих лекарственное средство, связанное с антителами посредством тиосукцинимидов.

**[0575]** Стабильность E02-GL-SG3932 в сыворотке крови яванского макака, мыши и крысы оценивали с применением иммунопреципитации с последующей восстановительной масс-спектрометрией с обращенной фазой (rLCMS). Измерения указывают на то, что в E02-GL-SG3932 происходит потеря менее 20% лекарственного средства после инкубации в сыворотке крови мыши, крысы и яванского макака, при этом 84,5%, 83,5% и 82,0% SG3924 оставалось присоединено к E02-GL-SG3932 в день 15 в образцах сыворотки крови мыши, крысы и яванского макака соответственно. Стабильность E02-GL-SG3932 в сыворотке крови человека оценивали с помощью иммунологического анализа захвата с применением смолы, покрытой B7-H4 человека, затем с помощью rLCMS (ONC8205-012). Измерения указывают на то, что потеря лекарственного средства после инкубации в сыворотке крови человека была умеренной, при этом 81% SG3924 оставался присоединен к E02-GL-SG3932 в день 15.

**[0576]** В данном примере указано, что механизмом высвобождения лекарственного средства является деконъюгация посредством обратной реакции Михаэля, а не расщепление линкера, что соответствует данным о других ADC, полученных путем конъюгации малеимида с аминокислотами, представляющими собой цистеин, задействованных в образовании дисульфидных связей между цепями.

## ПРИМЕР 29

Аффинность связывания Fab промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, с рекомбинантными антигенами B7-H4

**[0577]** Аффинность связывания Fab E02-INT, представляющего собой антитело к B7-H4, с рекомбинантными вариантами B7-H4 человека, яванского макака и мыши определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Значения константы диссоциации ( $K_D$ ), показанные в таблице 20, демонстрируют, что Fab E02-INT

связывается с иммобилизированными В7-Н4 человека и яванского макака со сходными значениями аффинности. Напротив, аффинность Fab E02-INT к мышинному антигену В7-Н4 является примерно в 100 раз более низкой, чем к человеческому антигену В7-Н4.

Таблица 20. Аффинность связывания Fab промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело к В7-Н4, с В7-Н4 человека, яванского макака и мыши, определенная с помощью SPR

Вид	$K_D$
Человек	3,70 нМ
Яванский макак	3,94 нМ
Мышь	405 ( $\pm$ 15) нМ

Fab: антигенсвязывающий фрагмент

#### ПРИМЕР 30

Аффинность связывания E02-GL-SG3932 с FcRn- и Fc $\gamma$ -рецепторами человека [0578] Аффинность связывания E02-GL-SG3932 с FcRn- и Fc $\gamma$ -рецепторами человека оценивали с помощью SPR. Аффинность связывания в стационарном состоянии ( $K_D$ ) FcRn человека с E02-GL-SG3932 составляет 4360 нМ. Равновесная  $K_D$  для E02-GL-SG3932 и huFc $\gamma$ RI составляла 4,35 нМ. Равновесная  $K_D$  для E02-GL-SG3932 и huFc $\gamma$ RIIa, huFc $\gamma$ RIIb, huFc $\gamma$ RIIIa-158V и huFc $\gamma$ RIIIa-158F находилась в диапазоне от 3307 до 21640 нМ.

#### ПРИМЕР 31

Сравнительная аффинность связывания промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, и E02-GL-SG3932 с антигеном, представляющим собой рекомбинантный В7-Н4 человека

[0579] Для оценки того, влияет ли конъюгация поражающего элемента, представляющего собой конструкцию топоизомераза 1-линкер, на свойства связывания антитела E02-INT, с применением способа DELFIA-ELISA и способа SPR измеряли аффинность связывания E02-INT и E02-GL-SG3932. Как показано на фигуре 33, результаты анализа с помощью DELFIA-ELISA указывают на то, что E02-INT и E02-GL-SG3932 связываются с иммобилизованным рекомбинантным В7-Н4 человека на сходном уровне со значениями EC50, составляющими 1,98 нМ и 1,71 нМ соответственно. Кинетические константы скоростей ( $k_{on}$  и  $k_{off}$ ) и равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) для E02-INT и E02-GL-SG3932 в отношении антигена, представляющего собой В7-Н4 человека, также определяли с помощью SPR с применением способа с захватом антитела. Как показано в таблице 21, E02-INT и E02-GL-SG3932 сходным образом связываются с В7-Н4 человека со значениями  $K_D$ , составляющими 31,1 нМ и 29,3 нМ соответственно.

Таблица 21. Аффинность связывания промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, и E02-GL-SG3932 с В7-Н4 человека, определенная с помощью SPR

Вид	$K_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (нМ)	$R_{max}$ (RU)
E02-INT	$9,38 \times 10^4$	$2,92 \times 10^{-3}$	31,1	56,8
E02-GL-SG3932	$9,55 \times 10^4$	$2,80 \times 10^{-3}$	29,3	49,7

RU: резонансная единица

**[0580]** Результаты в примерах 30 и 31 показывают, что свойства связывание антитела E02-INT сохраняются после конъюгирования с поражающим элементом, представляющим собой конструкцию топоизомеразы 1-линкер.

#### ПРИМЕР 32

Связывание на клетке промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, со сконструированными клетками HEK293, экспрессирующими В7-Н4 человека, яванского макака или мыши

**[0581]** Для измерения связывания антитела E02-INT с не подвергнутыми трансдукции клетками HEK293 Jump In TREX и с клетками HEK293 Jump In TREX, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека, мыши или яванского макака, применяли проточную цитометрию. Антитело E02-INT связывалось с клетками HEK293 Jump In TREX, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека, мыши и яванского макака, но не связывалось с В7-Н4-отрицательными не подвергнутыми трансдукции клетками HEK293 Jump In TREX (фигура 34). Связывание с клетками HEK293 Jump In TREX, экспрессирующими В7-Н4 мыши, было снижено по сравнению с таковым с клетками, экспрессирующими В7-Н4 человека или яванского макака.

#### ПРИМЕР 33

Связывание на клетках промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, и E02-GL-SG3932 с линиями клеток рака молочной железы человека и с клетками HT29, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека

**[0582]** Для измерения связывания антитела E02-INT и E02-GL-SG3932 с линиями клеток рака молочной железы человека MX-1 и MDA-MB-468 и со сконструированными клетками рака толстой кишки HT29, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека, применяли проточную цитометрию. Как показано на фигуре 35, E02-INT и E02-GL-SG3932 сходным образом связывались с клетками HT29, стабильно экспрессирующими В7-Н4 человека (HT29-huВ7-Н4-клон-4 и HT29-huВ7-Н4-клон-26), но не связывались с В7-Н4-отрицательными не подвергнутыми трансдукции HT29. E02-INT и E02-GL-SG3932

также связывались с клетками MX-1 и MDA-MB-468, что демонстрирует, что промежуточное соединение, представляющее собой антитело, и ADC могут распознавать эндогенно экспрессируемый В7-Н4 в линиях клеток рака человека. Связывание E02-INT и E02-GL-SG3932 было сопоставимым.

**[0583]** В примерах 32 и 33 продемонстрировано, что свойства связывания на клетках исходного антитела сохраняются после конъюгирования с поражающим элементом, представляющим собой конструкцию топоизомеразы 1-линкер.

#### ПРИМЕР 34

##### Цитотоксичность E02-GL-SG3932 *in vitro*

**[0584]** Эффект обработки с помощью E02-GL-SG3932 в отношении жизнеспособности клеток определяли с применением отрицательной по мишени линии клеток рака толстой кишки человека HT29, сконструированной линии клеток рака толстой кишки человека HT29-huB7-Н4-клон-26 и линии клеток рака молочной железы человека MX-1 с применением анализа CellTiter-Glo. Как показано на фигуре 36, E02-GL-SG3932 являлся цитотоксическим для клеток HT29-huB7-Н4-клон-26 и MX-1, экспрессирующих В7-Н4, при этом значение IC<sub>50</sub> составляло 0,036 мкг/мл и 0,029 мкг/мл соответственно. Напротив, не наблюдали отличия в активности между E02-GL-SG3932 и совпадающим по изотипу контрольным ADC (NIP228-SG3932) в отношении В7-Н4-отрицательной линии клеток HT29, что свидетельствует о том, что E02-GL-SG3932 может обеспечивать специфическое уничтожение раковых клеток, экспрессирующих В7-Н4 человека.

#### ПРИМЕР 35

##### Цитотоксичность E02-GL-SG3932 *in vitro*

**[0585]** В то время, как антитела IgG связываются с антигенами клеточной поверхности посредством их Fab-доменов, Fc-часть антител может вступать в контакт с FcγRIIIa на естественных клетках-киллерах. Взаимодействие Fc-домена с FcγRIIIa индуцирует образование поперечных связей между FcγR, что вызывает высвобождение цитотоксических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, что приводит к гибели клетки-мишени, этот процесс называется антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). Способность антитела E02-INT и E02-GL-SG3932 запускать ADCC-активность оценивали путем применения выделенных первичных NK-клеток человека и линии клеток рака молочной железы человека SKBR3 в качестве клетки-мишени. В данном анализе как E02-INT, так и E02-GL-SG3932 обеспечивали значительное повышение ADCC-активности сверх таковой для необработанных совместно культивированных клеток (фигуры 36А – 36С). Активность E02-GL-SG3932 слегка снижена по сравнению с E02-INT, однако это отличие не является статистически

значимым, что свидетельствует о том, что E02-INT и E02-GL-SG3932 могут вызывать ADCC-активность *in vitro*.

**[0586]** Далее клетки рака молочной железы человека SK-BR-3 культивировали совместно с NK-клетками, выделенными из организмов шести здоровых доноров, в присутствии 1 мкг/мл E02-GL-SG3932, промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, совпадающего по изотипу контрольного антитела NIP228 и совпадающего по изотипу контрольного ADC NIP228-SG3932 (фигура 37). ADCC-активность оценивали исходя из связывания с красителем Incycyte® Annexin V фосфатидилсерина, находящегося на внеклеточной поверхности на апоптотических клетках, с получением яркого и стабильного красного флуоресцентного сигнала. Кратность изменения рассчитывалась на основе максимального значения гибели клеток среди совместно культивированных клеток NK/SK-BR-3, не обработанных лекарственным средством. Максимальное значение гибели клеток рассчитывали путем деления среднего количества красных объектов в экспериментальных лунках на среднее максимальное значение гибели клеток среди обработанных стауроспорином клеток SK-BR-3.

#### ПРИМЕР 36

##### Поглощение и перенос в лизосому антитела E02-INT

**[0587]** Свойства поглощения и внутриклеточного переноса антитела E02-INT оценивали с применением количественного анализа с визуализацией живых клеток в клетках рака молочной железы человека MX-1 и клетках рака толстой кишки человека HT29-huB7-H4-клон-26, сверхэкспрессирующих B7-H4. Покадровые последовательные изображения показывали, что как в линии клеток рака молочной железы человека (MX-1), так и в линии клеток рака толстой кишки (HT29-huB7-H4-клон-26) интенсивный сигнал от E02-INT на мембране продолжает существовать от 0 минуты до 120 минуты с повышением поглощения E02-INT к 240 минуте (фигура 38, фигура 39А и фигура 39В). Измерение кинетических параметров поглощения в двух линиях клеток показало, что период до прохождения половины процесса поглощения составляет 127 ( $\pm$  35 SD) минут и 102 ( $\pm$  18 SD) минуты для клеток HT29-huB7-H4-клон-26 и MX-1 соответственно (фигура 39С).

**[0588]** Для определения внутриклеточного переноса E02-INT применяли конфокальную микроскопию с измерением совместной локализации с ранним эндосомальным маркером, антигеном ранней эндосомы 1 (EEA1), и лизосомальным маркером, ассоциированным с лизосомой мембранным белком 1 (LAMP1). Как показано на фигуре 40, обогащение в отношении E02-INT наблюдалось в субклеточном компартменте, в котором присутствует LAMP1, при этом совместная локализация с EEA1

была ограниченной, что указывает на то, что после поглощения, E02-INT переносится в лизосомальный компартмент клетки.

### ПРИМЕР 37

Активация с помощью E02-GL-SG3932 и SG3924 передачи сигнала в ответ на повреждение ДНК *in vitro*

**[0589]** Для оценки активации пути DDR в линии клеток рака молочной железы человека MX-1 и сконструированной линии клеток рака толстой кишки HT29-huB7-H4-клон-26 после обработки либо с помощью E02-GL-SG3932, либо с помощью его поражающего элемента, представляющего собой TOP1i, SG3924, применяли вестерн-блот. Как показано на фигуре 41, обработка клеток MX-1 либо с помощью 10 мкг/мл E02-GL-SG3932, либо с помощью 10 нМ SG3924 приводила к активации пути передачи сигнала ATM, что было заметно по повышению фосфорилирования ATM (Ser 1981) уже через 24 часа и сохранению в течение 72-часового периода обработки. Сходным образом, E02-GL-SG3932 и SG3924 индуцировали активацию ATR (фосфорилирование Thr 1989), наблюдаемую в моменты времени, составляющие 48 часов и 72 часа. После обработки через 24 часа наблюдали повышение  $\gamma$ H2AX, и оно сохранялось в течение 72-часового периода обработки, указывая на наличие повреждения ДНК.

**[0590]** Эффект E02-GL-SG3932 или его поражающего элемента TOP1i в отношении передачи сигнала DDR также изучали на линии клеток колоректального рака HT29-huB7-H4-клон-26, сконструированной с обеспечением экспрессии B7-H4. Как показано на фигуре 42, обработка либо с помощью 10 мкг/мл E02-GL-SG3932, либо с помощью 10 нМ SG3924 приводила к активации пути передачи сигнала DDR, о чем свидетельствовало повышение уровня фосфорилирования ATR (Thr 1989), его последующих мишеней Chk1 (Ser 345) и Chk2 (Thr 68). Данное повышение уровня фосфорилирования сохранялось в течение 72-часового периода обработки. Сходным образом, наблюдали активацию ATM (Ser 1981) и его последующей мишени KAP1 (Ser 824) после обработки с помощью E02-GL-SG3932 и поражающего элемента TOP1i в моменты времени, составляющие 48 часов и 72 часа. После обработки через 48 часов наблюдали повышение  $\gamma$ H2AX, и оно сохранялось в течение 72-часового периода обработки, указывая на наличие повреждения ДНК.

**[0591]** Взятые вместе эти результаты подтверждают, в двух разных линиях клеток, что E02-GL-SG3932 активирует путь DDR в соответствии с механизмом действия его поражающего элемента TOP1i.

Исследования *in vivo*

**[0592]** Исследования *in vitro* продемонстрировали, что E02-GL-SG3932 способен связываться с B7-H4 человека и яванского макака со сходной аффинностью, что E02-GL-SG3932 специфически связывается с опухолевыми клетками, экспрессирующими B7-H4, и является цитотоксическим для них, и может вызывать умеренную ADCC-активность в анализе с совместным культивированием с выделенными первичными NK-клетками, что промежуточное соединение E02-GL-SG3932 (E02-INT), представляющее собой антитело, поглощается опухолевыми клетками и переносится в лизосомальный компартмент, и что обработка с помощью E02-GL-SG3932 или его поражающего элемента TOP1i обеспечивает активацию пути передачи сигнала DDR в линиях клеток, экспрессирующих B7-H4. Для дополнительного разъяснения механизма действия E02-GL-SG3932 и установления того, свидетельствуют ли эти результаты исследований *in vitro* о наличии противоопухолевой активности, использовали мышинные модели *in vivo*.

## ПРИМЕР 38

Фармакодинамическое исследование E02-GL-SG3932 в модели на основе ксенотрансплантата HT29-huB7-H4-клон-26

**[0593]** Фармакодинамические эффекты после обработки с помощью E02-GL-SG3932 оценивали на мышинной модели на основе ксенотрансплантата опухоли человека с применением иммунодефицитных мышей SCID CB-17. Животным подкожно (SC) инокулировали линию клеток рака толстой кишки человека HT29-huB7-H4-клон-26, сконструированную с обеспечением экспрессии B7-H4 человека, и после того, как опухоли вырастали в объеме до примерно 250-300 мм<sup>3</sup>, животных рандомизировали, и каждая мышь получала внутривенную инъекцию либо E02-GL-SG3932, либо контрольных образцов. Опухоли собирали в установленные моменты времени, фиксировали в 10% нейтрально забуференном формалине, а затем обрабатывали и заливали в парафиновые блоки. Для исследования IgG человека, очагов  $\gamma$ H2AX, расщепленной каспазы-3 и плотности эпителиальных клеток в образцах опухолей с течением времени применяли методики ИHC-анализа и анализа изображений. Иллюстративные изображения ИHC для IgG человека,  $\gamma$ H2AX и расщепленной каспазы-3 в опухолях, собранных через 168 часов после одного внутривенного введения 7 мг/кг E02-GL-SG3932 или совпадающего по изотипу контрольного ADC NIP228-SG3932, показаны на фигурах 43A – 43F.

**[0594]** Как показано на фигурах 44A – 44D, наблюдалось дозозависимое накопление E02-GL-SG3932 в опухолевых клетках со временем, что было визуализировано с помощью ИHC-анализа в отношении IgG человека. Накопление E02-GL-SG3932 коррелировало с повышением уровня положительного окрашивания очагов

$\gamma$ H2AX, являющегося признаком индукции повреждения ДНК. С течением времени в обработанных с помощью E02-GL-SG3932 опухолях наблюдали повышение количества расщепленной каспазы-3 и общее уменьшение плотности эпителиальных клеток по сравнению с контролем.

**[0595]** Взятые вместе эти данные указывают на то, что E02-GL-SG3932 связывается с B7-H4 на опухолевых клетках, вызывая повреждение ДНК и апоптотическую гибель клеток.

#### ПРИМЕР 39

Противоопухолевая эффективность E02-GL-SG3932 в моделях на основе подкожных ксенотрансплантатов рака молочной железы человека и рака толстой кишки человека, эффективность *in vivo*, PDX

**[0596]** Противоопухолевую активность промежуточного соединения E02-INT, представляющего собой антитело, и E02-GL-SG3932 изучали на мышинных моделях на основе ксенотрансплантата опухолей человека с применением иммунодефицитных мышей SCID CB-17.

#### Модели на основе ксенотрансплантата из HT29 или HT29-huB7-H4-клон-26

**[0597]** Сначала E02-GL-SG3932 оценивали на паре моделей на основе ксенотрансплантата из линии клеток рака толстой кишки в двух отдельных исследованиях: HT29, которая является отрицательной по B7-H4, и HT29-huB7-H4-клон-26, которая получена из линии клеток HT29 и сконструирована с обеспечением экспрессии B7-H4 человека. В обоих исследованиях животным вводили путем SC инъекции либо клетки HT29, либо клетки HT29-huB7-H4-клон-26, и после того, как опухоли вырастали в объеме до среднего значения, составляющего 178 мм<sup>3</sup> (HT29) или 194 мм<sup>3</sup> (HT29-huB7-H4-клон-26), животных рандомизировали, и каждая мышь получала внутривенную инъекцию либо E02-GL-SG3932, либо контрольных образцов. Как показано на фигурах 45A и 45B, по сравнению с обработанной средой-носителем контрольной группой ни E02-GL-SG3932, ни совпадающий по изотипу контрольный ADC NIP228-SG3932 значительно не подавляли рост ксенотрансплантатных опухолей из HT29 при введении в виде одной внутривенной дозы при 10 мг/кг, демонстрируя TGI, составляющее 12% ( $p = 0,7006$ ) и 14% ( $p = 0,6593$ ) соответственно. Напротив, по сравнению с обработанной средой-носителем контрольной группой или совпадающим по изотипу контрольным ADC NIP228-SG3932, E02-GL-SG3932 значительно подавлял рост ксенотрансплантатных опухолей из HT29-huB7-H4-клон-26 при введении в виде одной внутривенной дозы при 5 мг/кг, 2,5 мг/кг и 1,25 мг/кг (фигуры 46A – 46C), при этом TGI

относительно такового в случае среды-носителя составлял 42% ( $p < 0,001$ ), 37% ( $p = 0,0005$ ) и 31% ( $p = 0,0039$ ) соответственно.

#### Модель на основе ксенотрансплантата рака молочной железы из MX-1

**[0598]** Эффект E02-GL-SG3932, совпадающего по изотипу контрольного ADC NIP228-SG3932 и E02-INT, промежуточного соединения E02-GL-SG3932, представляющего собой антитело, оценивали на модели на основе ксенотрансплантата рака молочной железы из MX-1. Животным вводили путем SC-инъекции клетки MX-1 и после того, как опухоли вырастали в объеме до среднего значения, составлявшего 270 мм<sup>3</sup>, животных рандомизировали, и каждая мышь получала внутривенную инъекцию тестируемого или контрольного образцов. По сравнению с обработанной средой-носителем контрольной группой E02-GL-SG3932 значительно подавлял рост ксенотрансплантатных опухолей из MX-1 при введении в виде одной внутривенной дозы при 5 мг/кг, 2,5 мг/кг и 1,25 мг/кг (фигуры 47А и 47В), что приводило к TGI, составляющему 100% ( $p < 0,001$ ), 96% ( $p < 0,001$ ) и 98% ( $p < 0,001$ ) соответственно.

**[0599]** Промежуточное соединение E02-INT, представляющее собой антитело, при введении при 10 мг/кг, не обеспечивало значительного подавления роста опухоли (TGI = -1%,  $p > 0,9999$ ). Отсутствие активности E02-INT при данном высоком уровне дозы у мышей SCID свидетельствует о том, что ADCC может быть не значимым влияющим фактором активности E02-GL-SG3932 *in vivo* и что противоопухолевые эффекты E02-GL-SG3932 вызываются посредством его поражающего элемента TOP1i.

#### Модели на основе ксенотрансплантатов рака молочной железы из MX-1 и MDA-MB-468

**[0600]** Для дополнительного разъяснения дозозависимого эффекта обработки с помощью E02-GL-SG3932 *in vivo* оценивали уровни доз, находящиеся в диапазоне от 0,125 мг/кг до 2 мг/кг, на моделях на основе ксенотрансплантатов рака молочной железы из MX-1 и MDA-MB-468. В обоих исследованиях животным вводили путем SC-инъекции либо клетки MX-1, либо клетки MDA-MB-468 и после того, как опухоли вырастали в объеме до среднего значения, составляющего примерно 138 мм<sup>3</sup> (MX-1) или 120 мм<sup>3</sup> (MDA-MB-468), животных рандомизировали, и каждая мышь получала внутривенную инъекцию либо E02-GL-SG3932, либо контрольного образца. Как показано на фигуре 48, одна внутривенная доза E02-GL-SG3932 приводила к дозозависимому подавлению ксенотрансплантатов из MX-1. В день 40 по сравнению с необработанной группой E02-GL-SG3932 приводил к 100% TGI при уровнях доз 2 мг/кг, 1,5 мг/кг и 1 мг/кг. Дозы E02-GL-SG3932, составляющие 0,75 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,25 мг/кг и 0,125 мг/кг приводили к дозозависимому %TGI, составляющему 99,7%, 80,1%, 52,1% и -5,5% соответственно.

Сходным образом, одна внутривенная доза E02-GL-SG3932 приводила к дозозависимому подавлению ксенотрансплантатов из MDA-MB-468 (фигура 49). В день 55 по сравнению с необработанной группой E02-GL-SG3932 приводил к 97,7%, 75,2% и 66,6% TGI при уровнях доз 2 мг/кг, 1,5 мг/кг и 1 мг/кг соответственно. Дозы E02-GL-SG3932, составляющие 0,75 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,25 мг/кг и 0,125 мг/кг приводили к дозозависимому %TGI, составляющему 52,8%, 58,4%, 25,5% и 31,8% соответственно.

#### ПРИМЕР 40

Противоопухолевая эффективность E02-GL-SG3932 в моделях трижды отрицательного рака молочной железы на основе ксенотрансплантатов, полученных из организма пациента

**[0601]** Противоопухолевую активность E02-GL-SG3932 изучали на панели из 26 PDX-моделей TNBC человека с применением бестимусных "голых" мышей с иммунной недостаточностью. Эти PDX-модели создавали из образцов опухолей человека без предварительного культивирования *in vitro* и изучали в отношении гистологии, цитогенетики, генетических и других биологических маркеров и в отношении их ответа на стандартные в клинической практике средства терапии. Фрагменты опухолей подкожно трансплантировали мышам и, как только опухоли вырастали в объеме до примерно 94-189 мм<sup>3</sup>, животных рандомизировали, и каждая мышь получала одну внутривенную инъекцию либо E02-GL-SG3932, либо контрольного образца в дозе, составляющей 1,25 мг/кг или 3,5 мг/кг. Для оценки взаимосвязи между экспрессией V7-N4 и эффективностью от 3 дополнительных мышей из каждой модели собирали свежие необработанные опухоли с объемом около 500-1183 мм<sup>3</sup>, фиксировали в 10% нейтрально забуференном формалине, а затем обрабатывали и заливали в парафиновые блоки. Затем для получения характеристик экспрессии V7-N4 на мембранах опухолевых клеток в каждой модели применяли методики ИHC-анализа и анализа изображений.

**[0602]** ИHC-анализ продемонстрировал, что в таких PDX-моделях проявлялась неоднородная экспрессия V7-N4 в опухоли с разными уровнями интенсивности ИHC окрашивания и долей окрашивания опухолей, в том числе одна модель характеризовалась практически невыявляемыми уровнями V7-N4 (HBCx-15) (фигура 50).

**[0603]** Подавление роста опухоли наблюдали после одной дозы E02-GL-SG3932, составляющей 1,25 мг/кг, при этом 46,2% моделей (12 из 26) демонстрировали снижение объема опухоли по сравнению с исходным уровнем, составляющее 30% или больше (фигура 51). Из них 75% (9 из 12) экспрессировали повышенные уровни V7-N4, при этом H-балл составлял 100 или больше (фигуры 52A и 52B). Для E02-GL-SG3932 при уровне дозы 1,25 мг/кг была идентифицирована значимая взаимосвязь между классификацией по

Н-баллу и статусом восприимчивости (точный критерий Фишера,  $p = 0,047$ ), что свидетельствует о том, что повышенные уровни В7-Н4 ассоциированы с ответом на лечение с помощью 1,25 мг/кг E02-GL-SG3932.

**[0604]** По сравнению с уровнем дозы 1,25 мг/кг наблюдали более высокую противоопухолевую активность после одной дозы E02-GL-SG3932, составляющей 3,5 мг/кг, при этом 69,2% (18 из 26) протестированных моделей демонстрировали снижение скорости роста опухоли по сравнению с исходным уровнем, составляющее 30% или больше (фигура 53). Из них 66,7% (12 из 18) экспрессировали повышенные уровни В7-Н4, при этом Н-балл составлял 100 или больше (фигуры 54А и 54В). При этом уровне дозы взаимосвязь между классификацией по Н-баллу и статусом восприимчивости не была статистически значимой (точный критерий Фишера,  $p = 0,073$ ).

**[0605]** Также наблюдали повышенную активность у изотипического контрольного ADC NIP228-SG3932 при этом уровне дозы, при этом 5 моделей (Т330, BCX-017-LOP, Т168, НВСх-15 и НВСх-6) демонстрировали снижение скорости роста опухоли по сравнению с исходным уровнем, составляющее 30% или больше (фигура 53). У этих 5 моделей была общая характеристика: дефектность гомологичной репарации ДНК, определяемая либо присутствием мутации BRCA1, либо отрицательным баллом в анализе образования очагов RAD51, что предлагается в качестве меры функционирования мощностей гомологичной репарации ДНК.

**[0606]** В этом примере продемонстрировано, что введение E02-GL-SG3932 в опухоли, которые характеризуются повышенными уровнями экспрессии В7-Н4 и являются дефектными по гомологичной репарации ДНК, определяемой (1) присутствием мутации BRCA1, (2) отрицательным баллом в анализе образования очагов RAD51, может обеспечивать снижение объема опухоли. На фигурах 53В – 33Е показано, что при низких дозах ответ на E02-GL-SG3932 коррелирует с уровнем экспрессии В7-Н4 и дефицитом HR. В отдельном исследовании на PDX-моделях, обработанных при 7 мг/кг, был продемонстрирован высокий уровень активности изотипического контрольного ADC (фигуры 60А – 60В и фигура 61).

**[0607]** В данном примере также продемонстрировано, что E02-GL-SG3932 показывает устойчивую активность в опухолях с дефицитом HR и в опухолях с профицитом HR при повышенном уровне В7-Н4, и что опухоли с дефицитом HR являются более чувствительными к повреждению, вызываемому TOP1i, и будут характеризоваться более низким пороговым уровнем экспрессии В7-Н4 для обеспечения активности.

## ПРИМЕР 41

Противоопухолевая эффективность E02-GL-SG3932 в моделях холангиокарциномы на основе ксенотрансплантатов, полученных из организма пациента

**[0608]** Противоопухолевую активность E02-GL-SG3932 изучали на панели из 37 PDX-моделей холангиокарциномы человека. На предварительной фазе исследования самкам мышей с разным генетическим фоном (бестимусные "голые" мыши, "голые" Balb/c или NOD/SCID) имплантировали фрагменты PDX из холангиокарциномы человека и обеспечивали их рост до размера, составляющего примерно 1000-1500 мм<sup>3</sup>. Затем эти опухоли собирали и повторно имплантировали исследуемым мышам. Когда опухоли достигали среднего объема опухоли, составляющего 150-300 мм<sup>3</sup>, то животных сортировали по объему опухолей на группу обработки или контрольную группу и в день 0 начинали введение доз. Каждая мышь получала одну внутривенную инъекцию E02-GL-SG3932 или контроля (необработанные) в дозе 1,25 мг/кг или 3,5 мг/кг. На фигурах 55A – 55G представлены результаты для первой исследованной панели. Результаты, показанные на фигурах 56A – 56K, представляют результаты для второй исследованной панели.

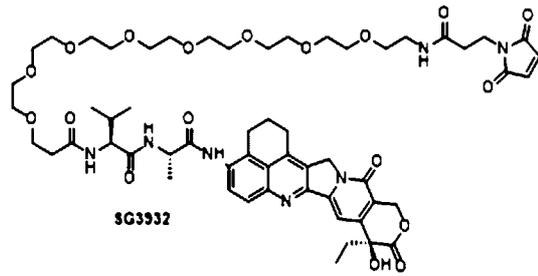
## ПРИМЕР 42

Поражающий элемент E02-GL-SG3932, представляющий собой TOP1i-линкер, сопряжен с более широким терапевтическим индексом (TI)

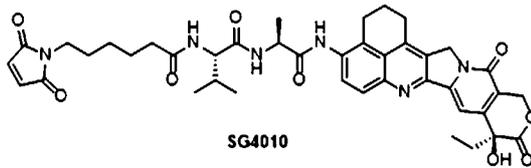
**[0609]** Исследования с прямым сравнением поражающего элемента, представляющего собой AZ'0133-линкер, выбранного для E02-GL-SG3932, проводили для определения эффективности, фармакокинетики и токсичности поражающего элемента SG3932 с четырьмя альтернативными линкерами. ADC с расщепляемой конструкцией линкер-поражающий элемент, представляющей собой линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932, предлагает наиболее широкий относительный TI и при сравнении является более подходящим по сравнению с эталоном. Четыре сравнительные конструкции линкер-поражающий элемент представлены ниже. Данные, собранные из сравнительных исследований, представлены в таблице 22.

Сравнительные конструкции линкер-поражающий элемент

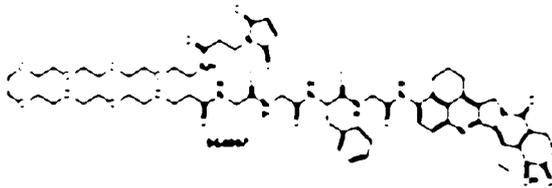
E02-INT-расщепляемый линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932



E02-INT-SG4010



E02-INT-SG4057



E02-INT-SG4052

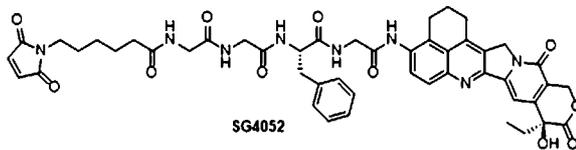


Таблица 22. Исследования с прямым сравнением эффективности, РК и токсичности антитела E02-INT с четырьмя альтернативными линкерами

	<b>E02-INT-SG3932</b>	<b>E02-INT-SG4010</b>	<b>E02-INT-SG4057</b>	<b>E02-INT-SG4052</b>
<b>Линкер + поражающий элемент</b>	<b>mp-PEG8-Val-Ala-SG3932</b>	<b>mc-Val-Ala-SG3932</b>	<b>mp-PEG8-GGFG-SG3932</b>	<b>mc-GGFG-SG3932</b>
<b>Гидрофобность (НІС), время удерживания (мин)</b>	3,41	3,37	3,76	3,53
<b>Стабильность в сыворотке крови <i>in vitro</i> (сред.% деконъюг. в день 15 относительно 0)</b>	24	68,4	28,4	69
<b>Цитотоксичность <i>in vitro</i>, IC50, МХ1/НТ29-клон-26 (нг/мл)</b>	8,81/53,3	5,54/40,6	14,4/44,0	6,21/67,6
<b>Эффективность в отношении МХ-1 <i>in vivo</i>, доза для обеспечения стазиса опухоли/30% регресса (мг/кг)</b>	0,57/1,27	0,83/1,18	0,92/1,02	1,02/1,85
<b>Эффективность в отношении MDA-MB-468 <i>in vivo</i>, доза для обеспечения стазиса опухоли/30% регресса (мг/кг)</b>	0,89/1,35	0,71/1,47	1,12/1,85	1,16/1,98
<b>РК у мыши SCID — CL (мл/день/кг) при 1,25 мг/кг</b>	11,3	20,4	14,6	19,0
<b>РК у крысы — CL (мл/день/кг) при 60 мг/кг (HNSTD)</b>	7,57	13,3	10,3	24,3
<b>Исследование токсичности на крысах (количество заключений про тяжесть, превосходящую исходный уровень/контроль,</b>	1/7	3/7	3/7	4/7

после введения дозы 20 или 60 мг/кг)				
Относительный TI для обеспечения стазиса опухоли в MX-1	152	101	82	44
Относительный TI для обеспечения 30% регресса опухоли в день 7 в MX-1	68	71	45	39

[0610] Конструкция линкер-поражающий элемент mp-PEG8-Val-Ala-SG3932 для E02-GL-SG3932 показывала лучшие результаты чем остальные конструкции сравнения. ADC, полученный с использованием расщепляемой конструкции линкер-поражающий элемент, представляющей собой линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932, при конъюгировании с антителом E02-INT является наиболее активной *in vivo* (фигура 57A и 57B). ADC с расщепляемой конструкцией линкер-поражающий элемент, представляющей собой линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932, проявляет наилучший профиль безопасности в исследовании токсичности на крысах, как показано на фигуре 58. ADC с расщепляемой конструкцией линкер-поражающий элемент, представляющей собой линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932, обладает хорошими PK-свойствами и наиболее широким относительным TI, как показано на фигуре 59. Относительный TI = отношение воздействия в виде AUC при наивысшей протестированной дозе у крыс (NOAEL, не HNSTD) к AUC, при которой обеспечивается стазис опухоли (модель из MX-1).

[0611] Как показано на фигуре 29B, расщепляемая конструкция линкер-поражающий элемент, представляющая собой линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932, может быть отличена от конъюгированного с TOP1i ADC сравнения и характеризуется ключевыми признаками, которые, как считается, вносят вклад в TI и обеспечивают преимущества. В частности, mp-PEG в расщепляемой конструкции линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932 стабилизирует конъюгат и вносит вклад в стабильность ADC, а лактоновый переключатель в расщепляемой конструкции линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932 может размыкаться при присоединении к ADC, что увеличивает эффективность поражающего элемента после поглощения путем рецепторопосредованного эндоцитоза (RME). (фигура 29B)

[0612] На фигурах 60A – 60B показано, что E02-GL-SG3932 характеризуется устойчивой активностью в PDX молочной железы и яичника. Панель A Противопухолевую активность E02-GL-SG3932 изучали на панели из моделей на основе PDX молочной железы и яичника. Каждая мышь (N = 1 на группу) получала одну внутривенную инъекцию E02-GL-SG3932 или контроля (необработанные) в дозе 7 мг/кг

или 3,5 мг/кг. На фигуре 60В показана противоопухолевая активность на панели PDX-моделей TNBC. Каждая мышь получала одну внутривенную инъекцию E02-GL-SG3932 или контроля, представляющего собой среду-носитель, в дозе 3,5 мг/кг или 1,25 мг/кг.

**[0613]** E02-GL-SG3932 также показал устойчивую активность в опухолях с дефицитом HR и в опухолях с профицитом HR при повышенных уровнях B7-H4 (фигуры 61 и 62A – D).

**[0614]** Кроме того, дефицит HR повышает чувствительность к поражающему элементу SG3932. Как показано на фигуре 63, существует сдвиг эффективности поражающего элемента SG3932 по сравнению с обработкой диметилсульфоксидом (DMSO) и поражающим элементом, представляющим собой ингибитор микротрубочек (MMAE), являющимся отрицательным контролем. Как показано на фигуре 63, жизнеспособность клеток составляла более 100% в случае обработки клеток дикого типа и BRCA2-/- клеток с помощью DMSO. Жизнеспособность клеток была снижена как в случае клеток дикого типа, так и в случае BRCA2-/- клеток при обработке с помощью поражающего элемента MMAE. Большое уменьшение жизнеспособности наблюдалось при обработке клеток дикого типа с помощью поражающего элемента SG3932 по сравнению с таковой для поражающего элемента MMAE. Однако, наибольшее уменьшение жизнеспособности (сдвиг эффективности в ~349 раз) наблюдалось при обработке BRCA2-/- клеток с помощью поражающего элемента SG3932. Это демонстрирует, что дефицит HR повышает чувствительность к поражающему элементу SG3932.

## СИНТЕЗ ИНГИБИТОРОВ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I

### Общая информация

**[0615]** Флэш-хроматографию проводили с применением Biotage® Isolera™ и фракций, проверенных на чистоту с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). TLC проводили с применением силикагеля Merck Kieselgel 60 F254 с флуоресцентным индикатором на алюминиевых пластинах. Визуализацию TLC осуществляли с помощью УФ-излучения.

**[0616]** Растворители для экстрагирования и хроматографии приобретали в VWR U.K. и применяли без дополнительной очистки.

**[0617]** Все чистые химические вещества приобретали в Sigma-Aldrich, если не указано иное. Пегилированные реагенты получали от Quanta biodesign (США) через Stratech (Великобритания).

## Условия LC/MS

## Способ А

**[0618]** Масс-спектрометрию с электрораспылением в режиме детекции положительно заряженных ионов проводили с применением Waters Aquity H-класс SQD2. Применяемыми подвижными фазами были растворитель А (вода с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты). Исходный состав с 5% В удерживали в течение 25 секунд, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 1 минуту 35 секунд. Состав удерживали в течение 50 секунд при 100% В, затем возвращали до 5% В за 5 секунд и удерживали при данном значении в течение 5 секунд. Общая продолжительность прогона градиента составляла 3,0 минуты. Скорость потока составляла 0,8 мл/минута. Детекцию осуществляли при 254 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1 x 50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1 мм x 5 мм.

## Способ В

**[0619]** HPLC (Waters Alliance 2695) проводили с применением подвижной фазы из воды (А) (0,1% муравьиной кислоты) и ацетонитрила (В) (0,1% муравьиной кислоты). Исходный состав с 5% В удерживали в течение 25 секунд, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 1 минуту 35 секунд. Состав удерживали в течение 50 секунд при 100% В, затем возвращали до 5% В за 5 секунд и удерживали при данном значении в течение 5 секунд. Общая продолжительность прогона градиента составляла 3,0 минуты. Скорость потока составляла 0,8 мл/минута. Диапазон значений длины волны при детекции: 190–800 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1 x 50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1 мм x 5 мм.

## Способ С

**[0620]** HPLC (Waters Alliance 2695) проводили с применением подвижной фазы из воды (А) (0,1% муравьиной кислоты) и ацетонитрила (В) (0,1% муравьиной кислоты).

**[0621]** Исходный состав с 5% В удерживали в течение 1 мин, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 9 мин. Состав удерживали в течение 2 мин при 100% В, затем возвращали до 5% В за 0,10 минуты и удерживали при данном значении в течение 3 мин. Общая продолжительность прогона градиента равнялась 15 мин. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин. Диапазон

значений длины волны при детекции: 190–800 нм. Температурный режим термостата: 50°C. Колонка: ACE Excel 2 C18-AR, 2 мкм, 3,0 x 100 мм.

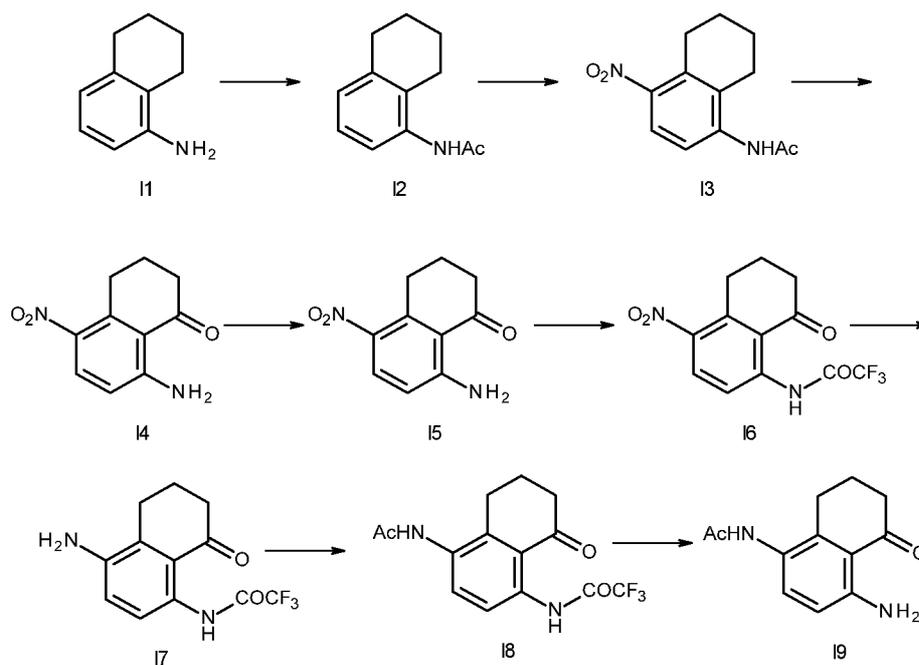
#### Условия HPLC

**[0622]** Сверхбыструю высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенной фазой (UFLC) проводили на аппарате Shimadzu Prominence™ с применением колонки Phenomenex™ Gemini NX, 5 мкм C18 (при 50°C) с размерами: 150 x 21,2 мм. Применяемыми элюентами были растворитель А (H<sub>2</sub>O с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (CH<sub>3</sub>CN с 0,1% муравьиной кислоты). Все эксперименты с применением UFLC проводили при следующих условиях градиентного элюирования. Концентрацию исходного состава с 13% В увеличивали до 30% В в течение периода времени, составлявшего 3 минуты, затем увеличивали до 45% В в течение 8 минут и снова увеличивали до 100% в течение 6 минут, а затем возвращали до 13% в течение 2 мин и удерживали в течение 1 мин. Общая продолжительность прогона градиента составляла 20,0 минуты. Скорость потока составляла 20,0 мл/минута, а детекцию осуществляли при 254 нм и 223 нм.

#### Способ ЯМР

**[0623]** Значения химического сдвига при проведении протонного ЯМР измеряли по дельта-шкале при 400 МГц с применением Bruker AV400. Применялись следующие сокращения: s, синглет; d, дублет; t, триплет; q, квартет; quin, квинтет; m, мультиплет; br, широкий. Константы взаимодействия приведены в Гц.

#### Синтез ключевых промежуточных соединений



а) N-(5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (**12**)

**[0624]** 5,6,7,8-Тетрагидронафталин-1-амин **II** (8,54 г, 58,0 ммоль) растворяли в дихлорметане (80 мл). Добавляли триэтиламин (18 мл, 129 ммоль) и смесь охлаждали до 0°C. Добавляли по каплям уксусный ангидрид (11,5 мл, 122 ммоль), после завершения добавления реакционную смесь нагревали до к. т. и перемешивали в течение 45 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, промывали с помощью H<sub>2</sub>O, насыщ. NaHCO<sub>3</sub>, 10% лимонной кислоты, органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали *in vacuo*. Грязно-белое твердое вещество растирали со смесью 1:3 Et<sub>2</sub>O/изогексан с получением **I2** (10,8 г, 57,1 ммоль, выход 98%) в виде белого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,44 мин (ES+) *масса/заряд* 190 [M + H]<sup>+</sup>.

б) N-(4-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (**I3**)

**[0625]** N-(5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид **I2** (1,00 г, 5,2840 ммоль) порциями добавляли к серной кислоте (15 мл, 281 ммоль) при -5°C. К реакционной смеси порциями добавляли нитрат натрия (450 мг, 5,2945 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин при -5°C, сразу после чего LCMS указывала на отсутствие дальнейшего протекания реакции. Реакционную смесь выливали на лед с наружным охлаждением, водную смесь экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, органическую фазу высушивали над MgSO<sub>4</sub> и очищали с помощью Isolera (10–80% EtOAc в изогексане) с получением смеси N-(4-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида **I3** и N-(2-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида (956 мг, 4,0811 ммоль, выход 77%) в виде белого/желтого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,53 мин (ES+) *масса/заряд* 235 [M + H]<sup>+</sup>.

с) N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (**I4**)

**[0626]** N-(4-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид **I3** (1,01 г, 4,31 ммоль) растворяли в ацетоне (30 мл). Добавляли сульфат магния в воде (3,9 мл, 5,9 ммоль, 1,5 моль/л) и смесь охлаждали до 0°C. К реакционной смеси порциями добавляли перманганат калия (2,07 г, 13,0 ммоль) и смесь нагревали до к. т. и перемешивали в течение 50 мин, сразу после чего TLC указывала на завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали через целит, твердые вещества промывали с помощью CHCl<sub>3</sub> и полученную органическую смесь промывали с помощью H<sub>2</sub>O, солевого раствора, высушивали над MgSO<sub>4</sub> и очищали с помощью Isolera (20–50% EtOAc в изогексане) с получением смеси N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида **I4** и N-(2-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида (709 мг, 2,86 ммоль, 66%) в виде белого/желтого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,44 мин (ES+) *масса/заряд* 190 [M + H]<sup>+</sup>.

d) 8-Амино-5-нитро-3,4-дигидронафталин-1(2H)-он (**I5**)

**[0627]** Смесь *N*-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида **I4** и *N*-(2-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида (709 мг, 2,8561 ммоль) и 6 н. хлористоводородную кислоту (7 мл) перемешивали при 80°C в течение 2,5 ч, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и 6 н. раствор NaOH добавляли до тех пор, пока значение pH не стало основным. Водную смесь экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали *in vacuo*. Очистка с помощью Isolera (0–50% EtOAc в изогексане) обеспечивала получение 8-амино-5-нитро-3,4-дигидронафталин-1(2H)-она **I5** (320 мг, 1,552 ммоль, выход 54%) в виде желтого/оранжевого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,54 мин (ES+) *масса/заряд* 207 [*M* + H]<sup>+</sup>.

e) 2,2,2-Трифтор-*N*-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (**I6**)

**[0628]** 8-Амино-5-нитро-3,4-дигидронафталин-1(2H)-он **I5** (430 мг, 2,0854 ммоль) растворяли в дихлорметане (20 мл). Добавляли пиридин (340 мкл, 4,20 ммоль) и смесь охлаждали до 0°C. Добавляли ангидрид трифторуксусной кислоты (590 мкл, 4,197 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, промывали с помощью H<sub>2</sub>O, органическую фазу высушивали над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали *in vacuo* с получением 2,2,2-трифтор-*N*-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида **I6** (630 мг, 2,0846 ммоль, выход >99%) в виде желтого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,86 мин (ES+) *масса/заряд* 301X [*M* - H]<sup>-</sup>.

f) *N*-(4-амино-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)-2,2,2-трифторацетамид (**I7**)

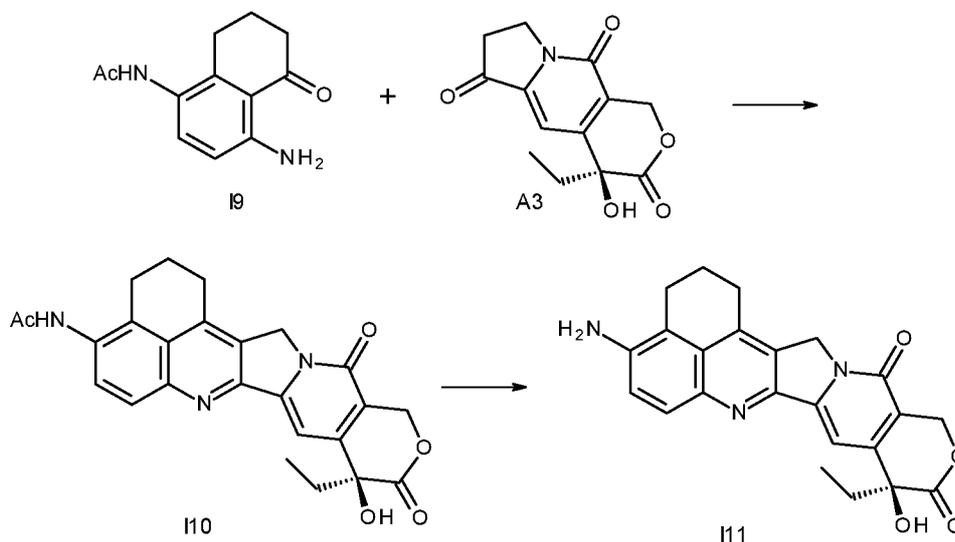
**[0629]** Цинк (2,73 г, 41,7 ммоль) суспендировали в метаноле (80 мл), муравьиной кислоте (4 мл) и воде (4 мл) и смесь охлаждали до 0°C. Порциями добавляли 2,2,2-трифтор-*N*-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид **I6** (568 мг, 2,0865 ммоль) и смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали, фильтрат разбавляли с помощью EtOAc и промывали с помощью насыщ. NaHCO<sub>3</sub>. Органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали *in vacuo* с получением *N*-(4-амино-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)-2,2,2-трифторацетамида **I7** (568 мг, 2,0865 ммоль, выход >99%) в виде желтого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,65 минуты (ES+) *масса/заряд* 273 [*M* + H]<sup>+</sup>

g) *N*-(4-ацетамидо-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)-2,2,2-трифторацетамид (**I8**)

**[0630]** *N*-(8-амино-4-оксотетралин-5-ил)-2,2,2-трифторацетамид **I7** (568 мг, 2,0865 ммоль) растворяли в дихлорметане (20 мл). Добавляли триэтиламин (580 мкл, 4,16 ммоль), а затем ацетилхлорид (297 мл, 4,173 ммоль), и смесь перемешивали в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$ , органическую фазу высушивали над  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали *in vacuo* с получением *N*-(8-ацетидамо-4-оксотетралин-5-ил)-2,2,2-трифторацетамида **I8** (655 мг, 2,084 ммоль, выход >99%) в виде желтого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,55 мин (ES+) *масса/заряд* 315 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

h) *N*-(4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (**I9**)

**[0631]** *N*-(8-ацетидамо-4-оксотетралин-5-ил)-2,2,2-трифторацетамид **I8** (2,77 г, 8,81 ммоль) растворяли в метаноле (240 мл) и воде (17 мл). Добавляли карбонат калия (4,88 г, 35,3 ммоль) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч при 50°C, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали, концентрировали *in vacuo*, растворяли в 10% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$ . Органическую фазу высушивали над  $\text{MgSO}_4$  и очищали посредством хроматографии с применением Isolera (2-15% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением *N*-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида **I9** (1,20 г, 5,50 ммоль, выход 62,3%) в виде желтого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 0,98 мин (ES+) *масса/заряд* 219 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.



i) (*S*)-*N*-(9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-4-ил)ацетамид (**I10**)

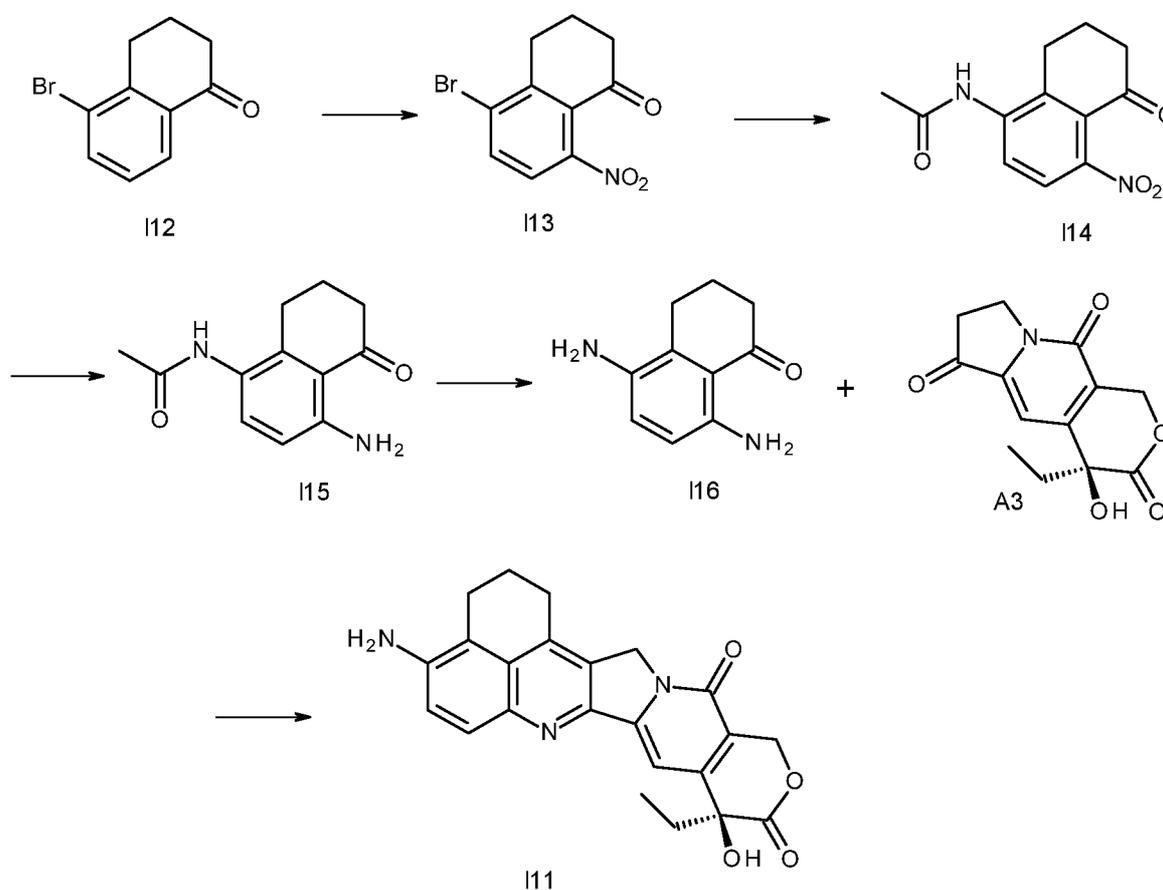
**[0632]** *N*-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамид **I9** (641 мг, 2,94 ммоль, 1,0 экв.), (*S*)-4-этил-4-гидрокси-7,8-дигидро-1H-пирано[3,4-*f*]индолизин-3,6,10(4H)-трион **A3** (840 мг, 3,19 ммоль, 1,1 экв.) и PPTS (740 мг, 2,95 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в толуоле

(60 мл) и перемешивали с обратным холодильником в течение 3 ч, сразу после чего LCMS указывала на то, что **I9** израсходовался. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали *in vacuo*. Полученные твердые вещества растирали с ацетонитрилом, а затем с ацетоном с получением соединения **I10** в виде коричневого твердого вещества с незначительной примесью TsOH (1,26 г, 96%). LC/MS (способ А): время удерживания 1,32 мин (ES+) *масса/заряд* 447 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

j) (S)-4-Амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион (**I11**)

**[0633]** (S)-N-(9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)ацетамид (**I10**) (1,26 г, 2,83 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в хлористоводородной кислоте (6 моль/л) в H<sub>2</sub>O (12 мл) и смесь перемешивали в течение 5 ч при 80°C, сразу после чего LCMS указывала на то, что **I10** израсходовался. Реакционную смесь разбавляли с помощью H<sub>2</sub>O и концентрировали *in vacuo* с получением (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-диона **I11** (1,51 г, 2,85 ммоль, 90 мас. %, выход 101%) в виде красного кристаллического твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,36 мин (ES+) *масса/заряд* 405 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

Альтернативный способ синтеза I11



Способ ИРС, контроля чистоты и анализа для данного синтеза

Устройство	Thermo U-3000
Колонка	ACE Excel 3 C18- PFP (3,0 мм × 150 мм)
Термостат	40°C
Подвижная фаза	А: 10 мМ формиата аммония в воде, рН=3,5
	В: CAN
Программа градиента	Время (мин)    А%    В%
	0,0                    90    10
	20,0                   10    90
	23,0                   10    90
	24,0                   90    10
	30,0                   90    10
	Время повторного уравнивания: 6 мин
Скорость потока	1,0 мл/мин
Детектор	УФ 220 нм
Разбавитель	CAN

а) 5-Бром-8-нитротетралин-1-он (**II3**)

**[0634]** Раствор нитрата калия (1,15 экв., 13,83 г), растворенного в серной кислоте (конц., 5,0 отн. об., 160 мл), добавляли (время добавления 4–12 ч., поддержание температуры ниже 10°C) к раствору 5-бромтетралин-1-она (**II2**) (1,0 экв., 26,77 г) в серной кислоте (конц., 5,0 отн. об., 160 мл) в атмосфере азота. После завершения реакции реакционную смесь переносили в колбу, содержащую воду (36 отн. об., 1,15 л), регулируя скорость переноса таким образом, чтобы поддерживать температуру ниже 10°C. Полученное твердое вещество фильтровали, трижды промывали водой (4,0 отн. об., 128 мл) и затем сушили при ~40°C в течение 24 ч. Сухой осадок растворяли в смеси ацетона (2,5 отн. об., 80 мл) и воды (0,38 отн. об., 12,2 мл), нагретой до ~75°C, и затем охлаждали до ~20°C. Полученное твердое вещество удаляли посредством фильтрации. Растворитель заменяли на этанол посредством перегонки и объем раствора сокращали до 2,0 отн. об. (64 мл). Раствор охлаждали до ~25°C и полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации. Твердое вещество промывали этанолом (1,0 отн. об., 32 мл), затем сушили под вакуумом при 40°C с получением 5-бром-8-нитротетралин-1-она **II3** (15,36 г, 40%) в виде коричневого твердого вещества; RT 14,0 минуты.

**Способ 1** Способ ИРС, контроля чистоты и анализа для бром-8-нитротетралин-1-она.

Устройство	Thermo U-3000
Колонка	ACE Excel 3 C18- PFP (3,0 мм × 150 мм)
Термостат	40°C
Подвижная фаза	A: 10 mM формиата аммония в воде, рН=3,5
	B: CAN
Программа градиента	Время (мин) A% B%
	0,0 90 10
	20,0 10 90
	23,0 10 90
	24,0 90 10
	30,0 90 10
	Время повторного уравнивания: 6 мин
Скорость потока	1,0 мл/мин
Детектор	УФ 220 нм
Разбавитель	CAN

б) N-(8-нитро-1-оксотетралин-5-ил)ацетамид (II4)

**[0635]** Раствор бром-8-нитротетралин-1-она (II3) (1,0 экв., 18,0 г, 90,6% вес/вес), ацетамида (1,2 экв., 4,72 г), трис(дибензилиденацетон)дипалладия(0) (0,01 экв., 0,61 г) и фосфата калия (1,4 экв., 19,8 г) в диоксане (15 отн. об., 270 мл) в атмосфере азота нагревали до ~70°C. После завершения реакции раствор охлаждали до ~20°C, а также разбавляли диоксаном (5 отн. об., 90,0 мл) и фильтровали. Растворитель заменяли на этанол и объем сокращали до общего реакционного объема, составляющего 3 отн. об. (54,0 мл). Раствор охлаждали до ~20°C и полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали с помощью МТВЕ (метил-трет-бутиловый эфир) (1,0 отн. об., 18,0 мл). Твердое вещество сушили под вакуумом при 40°C с получением N-(8-нитро-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида II4 (10,0 г, 60,6%) в виде темно-желтого твердого вещества; RT 8,86 минуты.

с) N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамид (II5)

**[0636]** Гидроксид палладия на угле (20% вес/вес, 0,15 экв., 5,25 г) добавляли к раствору N-(8-нитро-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида (II4) (1,0 экв., 32,6 г) в метаноле (40 отн. об., 1250 мл). Реакционную смесь помещали в атмосферу водорода при давлении ~40 фунт/кв. дюйм и температуре ~40°C на 8 ч. Водород удаляли и заменяли азотом, и катализатор удаляли посредством фильтрации через целлюлозу, промывая целлюлозу метанолом (4,0 отн. об., 130 мл). Объем раствора сокращали до 4,0 отн. об. посредством

перегонки и затем разбавляли с помощью МТВЕ (4 отн. об. 130 мл). Полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали с помощью МТВЕ (2 отн. об., 65 мл) и сушили под вакуумом при 40°C с получением N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида **II5** (21,1 г, 77,8%) в виде серо-зеленого твердого вещества; RT 5,44 минуты.

d) 5,8-Диаминотетралин-1-он (**II6**)

**[0637]** Раствор N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида (**II5**) (1,0 экв., 10,0 г) в хлористоводородной кислоте (5 М, 6,0 отн. об., 60 мл) выдерживали при ~90°C в течение 3 ч. Температуру понижали до 25°C и добавляли гидроксид натрия (2 М, 4,0 отн. об., 40 мл) до тех пор, пока не достигалось значение pH, составляющее 10,0, при этом поддерживая температуру 25°C. Полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали водой (2,0 отн. об., 20 мл). Влажный осадок растворяли в тетрагидрофуране (60 отн. об., 600 мл) и фильтровали. Раствор концентрировали до 5,0 отн. об. и добавляли гептан (20 отн. об., 200 мл). Раствор концентрировали до 10,0 отн. об. и дополнительно добавляли гептан (20 отн. об., 200 мл), а затем объем снова сокращали до 10,0 отн. об. Полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали гептаном (5,0 отн. об., 50 мл). Твердое вещество высушивали под вакуумом при 40°C в течение 17 ч с получением 5,8-диаминотетралин-1-она (**II6**) (6,90 г, 82,7%) в виде желтого твердого вещества; 1H ЯМР (400 МГц DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,82 (m, 2H), 2,38 (t, J=2,0 Гц, 2H), 2,47 (t, J=2,0 Гц, 2H), 6,34 (d, J=2,0 Гц, 1H), 6,68 (d, J=2,0 Гц, 1H); RT 3,90.

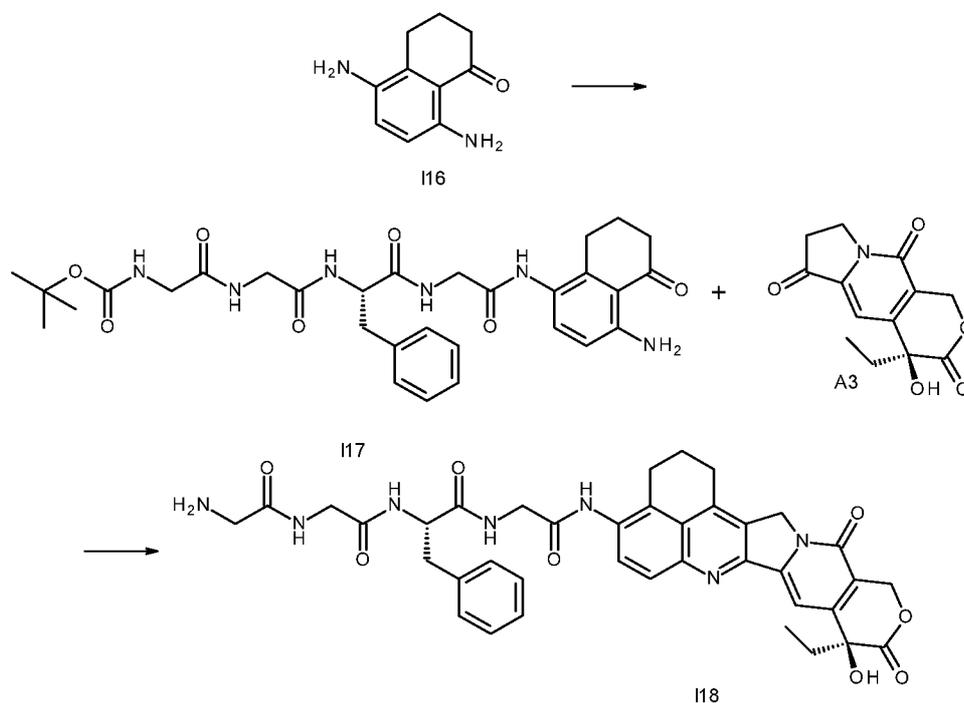
e) (S)-4-Амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-

бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион (**II1**)

**[0638]** Раствор 5,8-диаминотетралин-1-она (**II6**) (1,0 экв., 5,0 г), (4S)-4-этил-4-гидрокси-7,8-дигидро-1H-пирано[3,4-f]индолизин-3,6,10-триона (**A3**) (1,06 экв., 7,9 г) и пара-толуолсульфоната пиридиния (1,0 экв., 7,2 г) в толуоле (50,0 отн. об., 250 мл) выдерживали при 120°C в течение 15 ч. Объем раствора сокращали до 2,0 отн. об. и затем разбавляли ацетонитрилом (20 отн. об., 100 мл) и водой (20 отн. об., 100 мл). Полученную взвесь фильтровали и твердое вещество промывали водным ацетонитрилом (1:1, 20 отн. об., 100 мл). Твердое вещество суспендировали в водном метаноле (вода:MeOH 3:1, 40 отн. об., 200 мл), фильтровали и промывали водным метанолом (1:1, 20 отн. об., 100 мл). Твердое вещество суспендировали в воде (60 отн. об., 300 мл) при 50°C, фильтровали и промывали водой (10 отн. об., 50 мл). Твердое вещество суспендировали в водном ацетонитриле (вода: ацетонитрил, 1:3, 40 отн. об., 200 мл) при 30°C, фильтровали и промывали водным ацетонитрилом (вода: ацетонитрил, 1:3, 5 отн. об., 50 мл) и затем сушили под вакуумом при 40°C с получением (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-

1,2,3,9,12,15-гексагидро-10Н,13Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-10,13-диона (**II1**) в виде белого твердого вещества (5,0 г, 43,7%); RT 5,13.

### Синтез II8



а) трет-Бутил-(S)-(2-(((2-(((1-(((4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)карбамат (II7)

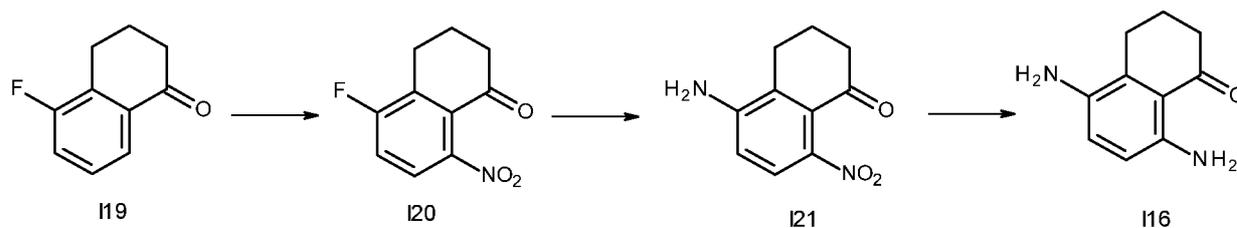
**[0639]** Вос-GGFG-OH (227 мг, 0,52 ммоль) и EEDQ (157 мг, 0,634 ммоль) солюбилизировали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и смесь перемешивали в течение 15 мин, пока пептид не переходил в раствор. Затем добавляли соединение **II6** (100 мг, 0,56747 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции. По результатам LVMS через 1 ч. реакция выглядела завершённой на 90%. Смесь становилась более густой по мере осаждения продукта. Смесь оставляли на еще один час перед проведением вакуумной сушки. Неочищенное вещество поглощали в Et<sub>2</sub>O (50 мл). Твердое вещество фильтровали и затем поглощали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) для дополнительной очистки. Твердое вещество фильтровали и сушили с получением продукта **II7** (273 мг, 0,459 ммоль, выход 80,9%) в виде серого твердого вещества. Аналитические данные: LCMS: 3 мин: ES<sup>+</sup> = 1,46 мин, масса/заряд 595,7 [M + H]<sup>+</sup>.

б) (S)-2-(2-(2-Аминоацетида)ацетида)-N-(2-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)-3-фенилпропанамида (II8)

**[0640]** Анилин **II7** (450 мг, 1,045 ммоль), лактон **A5** (280 мг, 1,064 ммоль) и *n*-толуолсульфонат пиридиния (273 мг, 1,086 ммоль) солюбилизировали в толуоле (20 мл) и

смесь нагревали до 150°C (при высоком коэффициенте дефлегмации). Для содействия солюбилизации смеси добавляли MeOH (4 мл). Через 7 ч неочищенную реакционную смесь доводили до сухости в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, от 100% до 65:35) с получением продукта **I18** (259 мг, 0,359 ммоль, выход 78,1). Аналитические данные: LCMS: 3 мин: ES<sup>+</sup> = 1,17 мин, *масса/заряд* 722,8 [M + H]<sup>+</sup>.

#### Альтернативный способ синтеза I16



#### а) 5-Фтор-8-нитротетралин-1-он (I20)

**[0641]** 5-Фтортетралин-1-он **I19** (4,7 г, 29 ммоль) солюбилизировали в 1/2 количества серной кислоты (120 мл) в 3-горлой круглодонной колбе. Смесь перемешивали до полного растворения твердого вещества и затем охлаждали до 0–5°C. В капельной воронке растворяли нитрат калия (3 г, 29,6730 ммоль) в оставшейся половине серной кислоты (120 мл) при 0–5°C. Медленно добавляли к смеси SM, следя, чтобы раствор оставался прохладным (45 мин). Перемешивали при 0–5°C до завершения реакции. Затем реакционную смесь гасили с помощью воды (250 мл) и оставляли перемешиваться при 0–5°C. Твердое вещество фильтровали и промывали водой (50 мл). Твердое вещество сушили в вакуумной печи в течение 2 ч при 50°C. Неочищенное твердое вещество суспендировали в Et<sub>2</sub>O на протяжении ночи, а затем охлаждали до 0°C и фильтровали. Влажный осадок промывали дополнительным количеством холодного Et<sub>2</sub>O (50 мл) и оставляли сушиться в вакуумной печи при 50°C с получением чистого продукта **I20** (5,5 г, 26 ммоль, выход 92%) в виде светло-розового тонкодисперсного порошка. LCMS (способ В): ES<sup>+</sup> = 1,55 мин, *масса/заряд* 210,1 [M + H]<sup>+</sup>.

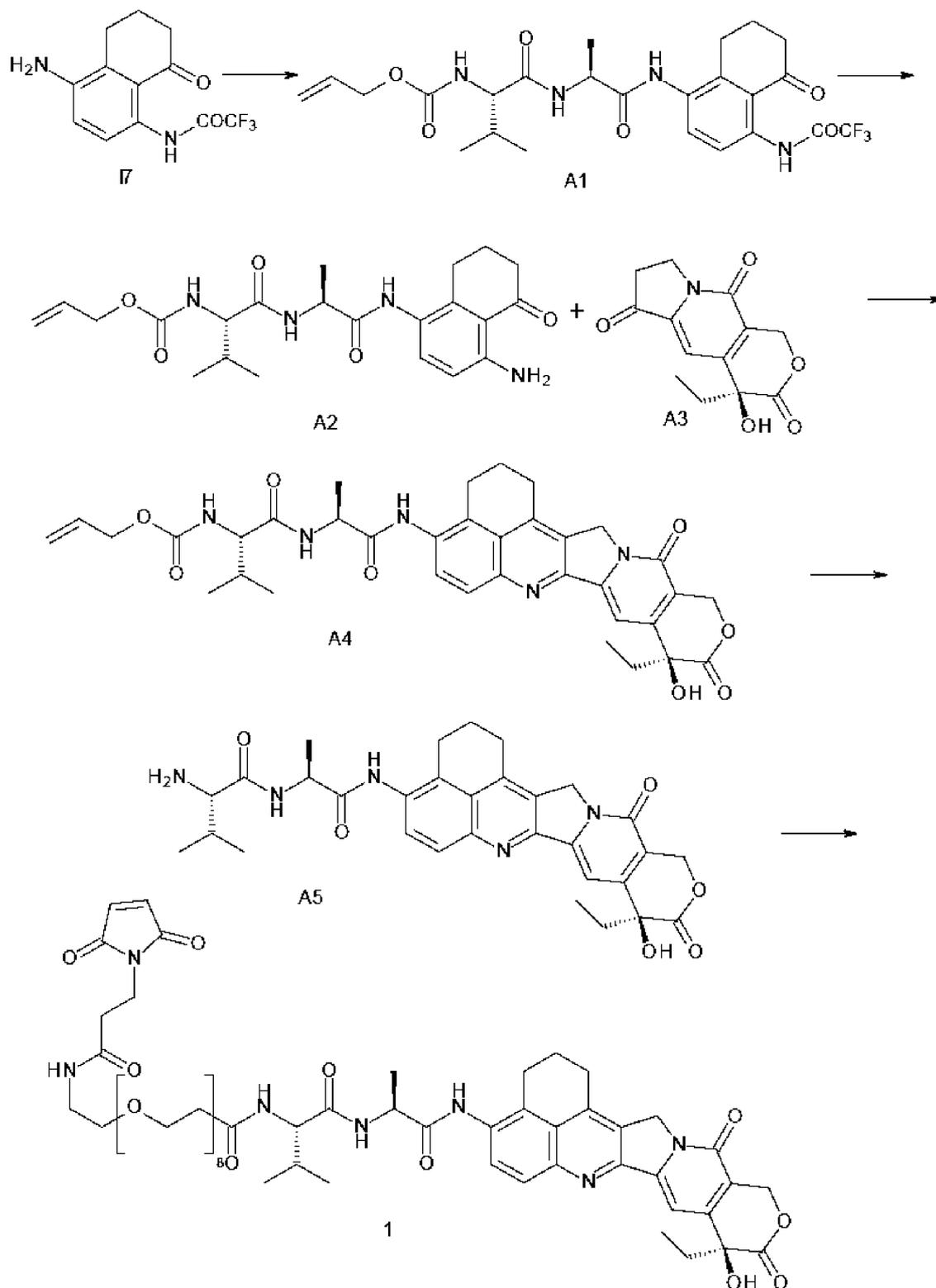
#### б) 5-Амино-8-нитротетралин-1-он (I21)

**[0642]** Соединение **I20** (2,7 г, 13 ммоль) солюбилизировали в CH<sub>3</sub>CN (2,5 мл) и NH<sub>4</sub>OH (21 мас. %) в H<sub>2</sub>O (8 мл, 40 ммоль) вносили в герметично закрываемую устойчивую к давлению пробирку и нагревали до 185°C. После завершения смесь переносили в круглодонную колбу и обрабатывали вакуумом. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/MeOH; от 100 до 99:1) с получением чистого продукта **I21** (1,1 г, 5,3 ммоль, выход 41%) в виде черного твердого вещества. LCMS (способ В): ES<sup>+</sup> = 1,34 мин, *масса/заряд* 207,1 [M + H]<sup>+</sup>.

## с) 5,8-Диаминотетралин-1-он (II6)

**[0643]** Соединение **I21** (1,35 г, 6,55 ммоль) растворяли в смеси метанола (20 мл), H<sub>2</sub>O (1 мл) и муравьиной кислоты (1 мл) при 0°C. Медленно добавляли цинк (8,5 г, 130 ммоль), следя за поддержанием температуры ниже 40°C. Для ускорения завершения реакции добавляли дополнительное небольшое количество муравьиной кислоты/H<sub>2</sub>O (0,5 мл). Реакционную смесь фильтровали и фильтрат разбавляли с помощью EtOAc и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с последующей обработкой вакуумом. Неочищенное вещество вводили сухим способом в систему для проведения колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc; от 100 до 7:3, затем CHCl<sub>3</sub>/MeOH; от 99:1 до 98:2) с получением чистого продукта **II6** (1,015 г, 5,760 ммоль, выход 88,0%). LCMS (способ B): ES<sup>+</sup> = 0,2 мин, значение *масса/заряд* не наблюдали.

## Пример синтеза 1 (например, синтез SG3932)



а) Аллил-((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((5-оксо-4-(2,2,2-трифторацетидамо)-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)пропан-2-ил)амино)бутан-2-ил)карбамат  
(A1)

[0644] DCC (6,54 г, 31,7 ммоль) и НОРО (3,36 г, 30,2 ммоль) добавляли к раствору alloc-Val-Ala-OH (9,09 г, 31,7 ммоль) и **I7** (7,85 г, 28,8 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 мл) при 25°C.

Полученную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Белое твердое вещество, которое образовалось во время протекания реакции, отфильтровывали и промывали с помощью холодного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Фильтрат промывали водой (150 мл) и солевым раствором (150 мл). Органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали.

Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле (Hex/EtOAc, 60:40). Выделенный продукт **A1** был загрязнен совместно элюируемой DCU (21,1 г, выход 140%). LC/MS (способ B):  $\text{ES}^+ = 1,81$  мин, *масса/заряд* 527,6  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

b) Аллил-((S)-1-(((S)-1-((4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (**A2**)

**[0645]** Защищенный анилин **A1** (18 г, 34,19 ммоль) солубилизировали в смеси MeOH и  $\text{H}_2\text{O}$  10:1 (165 мл) и добавляли  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 г, 72,36 ммоль). Смесь перемешивали при  $50^\circ\text{C}$  до завершения реакции. Смесь обрабатывали вакуумом до почти полной сухости, и остаток поглощали с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и солевого раствора, затем сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , от 100% до 7:3). Выделенный продукт **A2** был загрязнен совместно элюируемой примесью (10,71 г, выход 73%). LC/MS (способ B):  $\text{ES}^+ = 1,46$  мин, *масса/заряд* 431,7  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

c) Аллил-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хиолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метилбутан-2-ил)карбамат (**A4**)

**[0646]** Анилин **A2** (450 мг, 1,045 ммоль), лактон **A3** (280 мг, 1,064 ммоль) и *n*-толуолсульфонат пиридиния (273 мг, 1,086 ммоль) солубилизировали в толуоле (20 мл) и смесь нагревали до  $130^\circ\text{C}$  (при высоком коэффициенте дефлегмации). Для содействия солубилизации смеси периодически добавляли несколько капель MeOH. Через 7 ч неочищенную реакционную смесь доводили до сухости в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , от 100% до 95:5) с получением продукта **A4** (360 мг, выход 52,3%). LC/MS (способ B):  $\text{ES}^+ = 1,51$  мин, *масса/заряд* 658,8  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

d) Аллил-(S)-2-амино-N-((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хиолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид (**A5**)

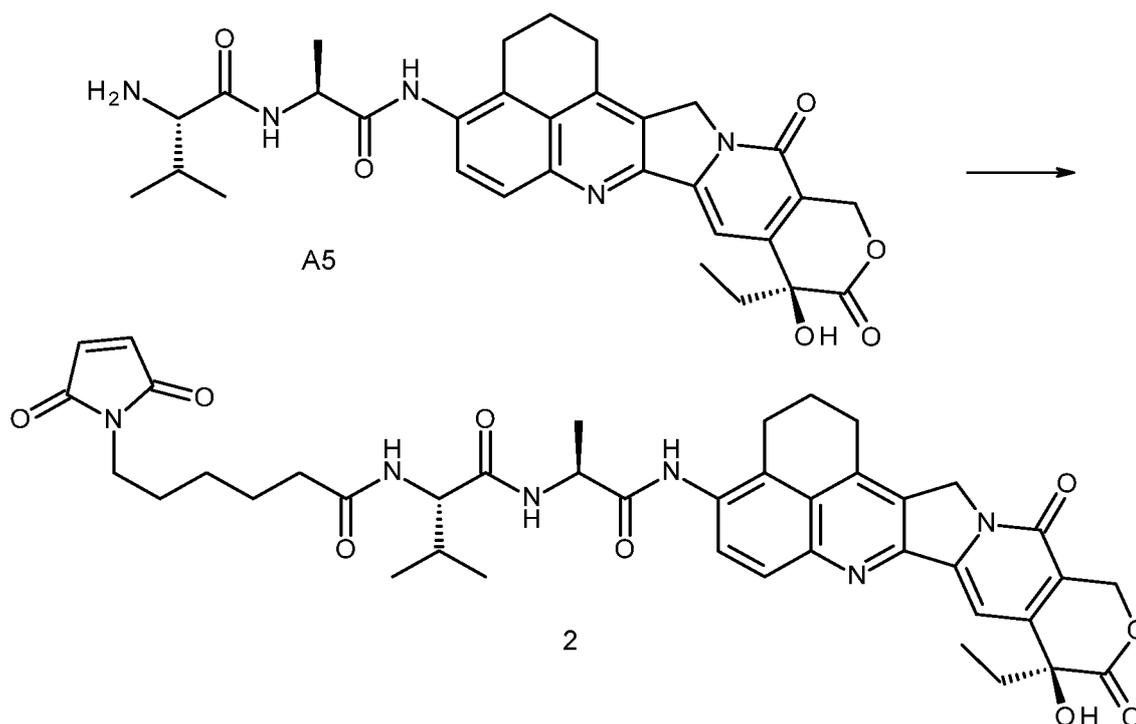
**[0647]** Избыток пиперидина (642 мкл) добавляли к раствору **A4** (543 мг, 0,82 ммоль) и  $\text{PdP}(\text{Ph}_3)_4$  (89 мг, 0,08 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 20 мин, по окончании которых реакция была завершена (при контроле посредством LC/MS). Реакционную смесь

разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (25 мл) и солевого раствора (25 мл). Органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **A5**, который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии. LC/MS (способ B):  $\text{ES}^+ = 1,15$  мин, *масса/заряд* 574,6  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

е) 1-(3-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-амид (**1**)

**[0648]** Пиридин (83 мкл, 1,03 ммоль) и Mal-dPEG<sub>8</sub>-OTFP (767 мг, 1,03 ммоль) добавляли к раствору неочищенного **A5** (расчетное количество 1,03 ммоль) в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли 0,5 экв. Mal-dPEG<sub>8</sub>-OTFP в качестве попытки ускорить реакцию. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 50 мл) и солевого раствора, затем сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством HPLC с обращенной фазой (градиент  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} + 0,05\% \text{FA}$ ) и подвергали сублимационной сушке с получением **1** (1,189 г, выход 31% после 2 стадий). LC/MS (способ B):  $\text{ES}^+ = 1,43$  мин, *масса/заряд* 1149,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . LC/MS (способ C):  $\text{ES}^+ = 5,37$  мин, *масса/заряд* 1149,4  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

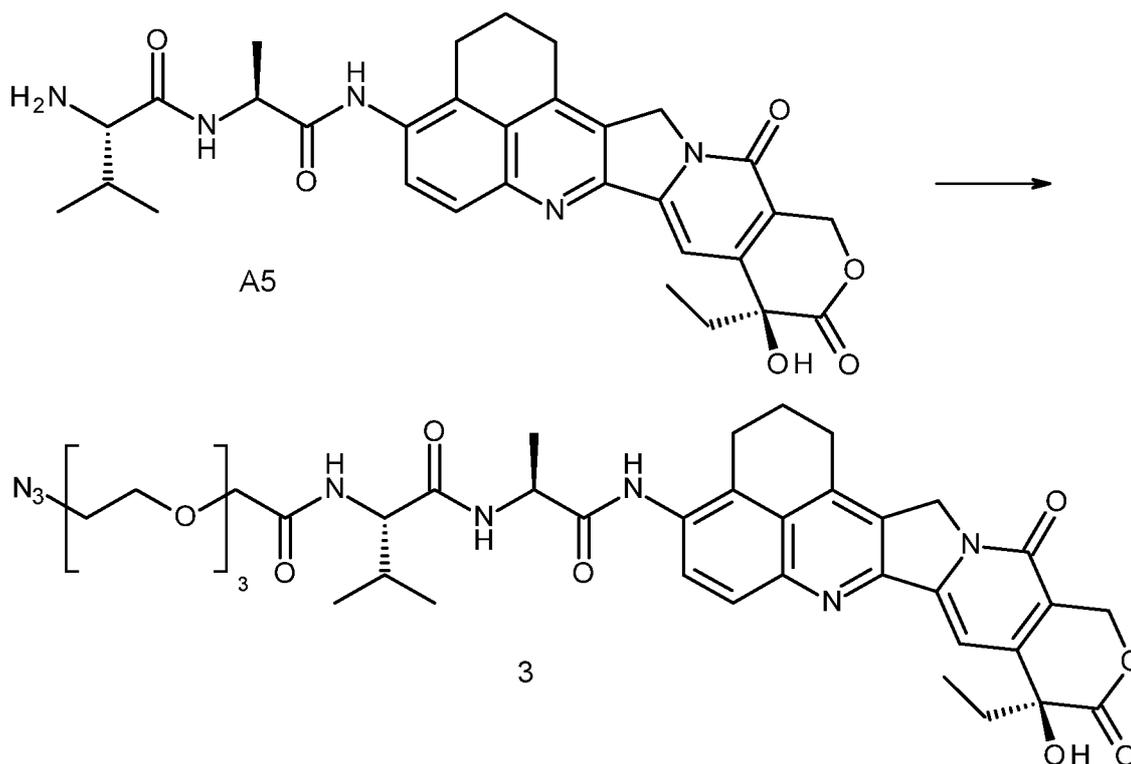
## Пример синтеза 2 (например, синтез SG4010)



6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)гексанамид (**2**)

**[0649]** Mal-капроновую кислоту (56 мг, 0,26 ммоль) и EDCI.HCl (51 мг, 0,26 ммоль) добавляли к раствору неочищенного **A5** (расчетное количество 0,26 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли дополнительные 0,5 экв. Mal-капроновой кислоты и EDCI.HCl. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2 x 50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5) с получением **2** (31,6 мг, выход 20% после 2 стадий). LC/MS (способ B): ES<sup>+</sup> = 1,56 мин, масса/заряд 767,8 [M + H]<sup>+</sup>. LC/MS (способ C): 15 мин: ES<sup>+</sup> = 6,05 мин, масса/заряд 767,8 [M + H]<sup>+</sup>.

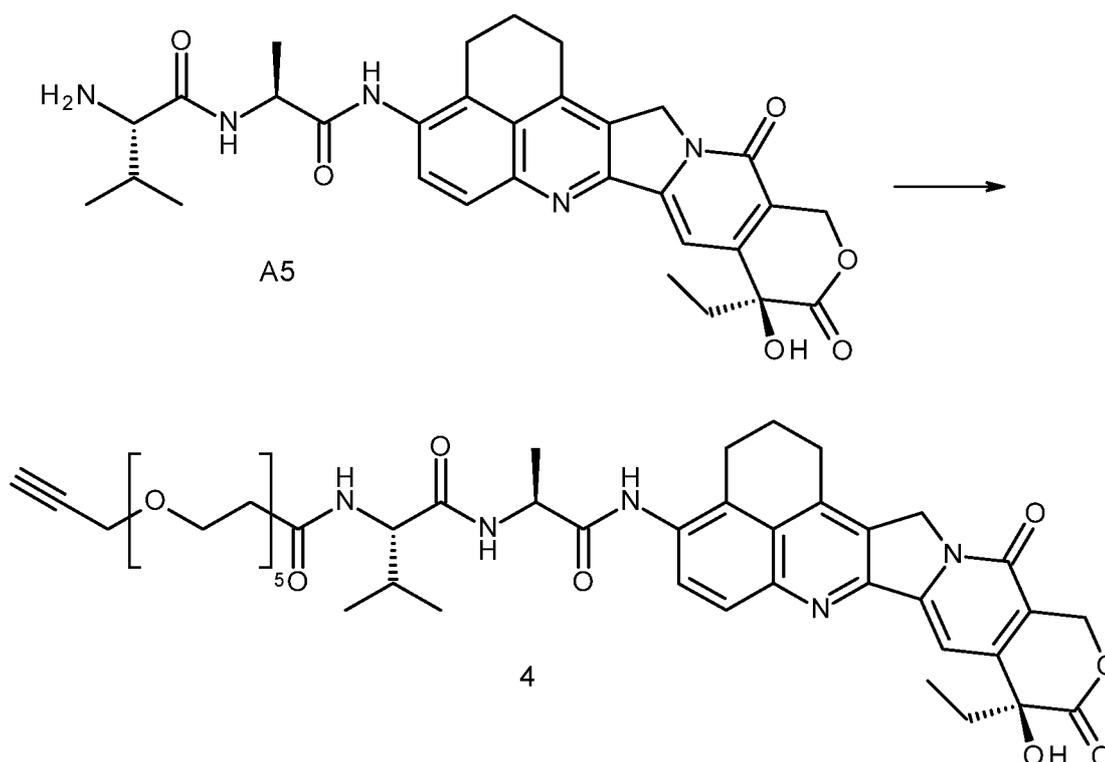
## Пример синтеза 3



(S)-2-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)ацетиамидо)-N-((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид (**3**)

**[0650]** Азидо-dPEG<sub>3</sub>-кислоту (77,5 мг, 0,31 ммоль) и EDCI.HCl (60 мг, 0,31 ммоль) добавляли к раствору неочищенного **A5** (расчетное количество 0,31 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли дополнительные 0,5 экв. азидо-dPEG<sub>3</sub>-OH и EDCI.HCl. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2 x 50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством препаративной HPLC и фракции подвергали сублимационной сушке с получением чистого **3** (92,2 мг, выход 24,7% после 2 стадий). LC/MS (способ B): ES<sup>+</sup> = 1,69 мин, масса/заряд 789,9 [M + H]<sup>+</sup>. LC/MS (способ C): ES<sup>+</sup> = 6,68 мин, масса/заряд 790,0 [M + H]<sup>+</sup>.

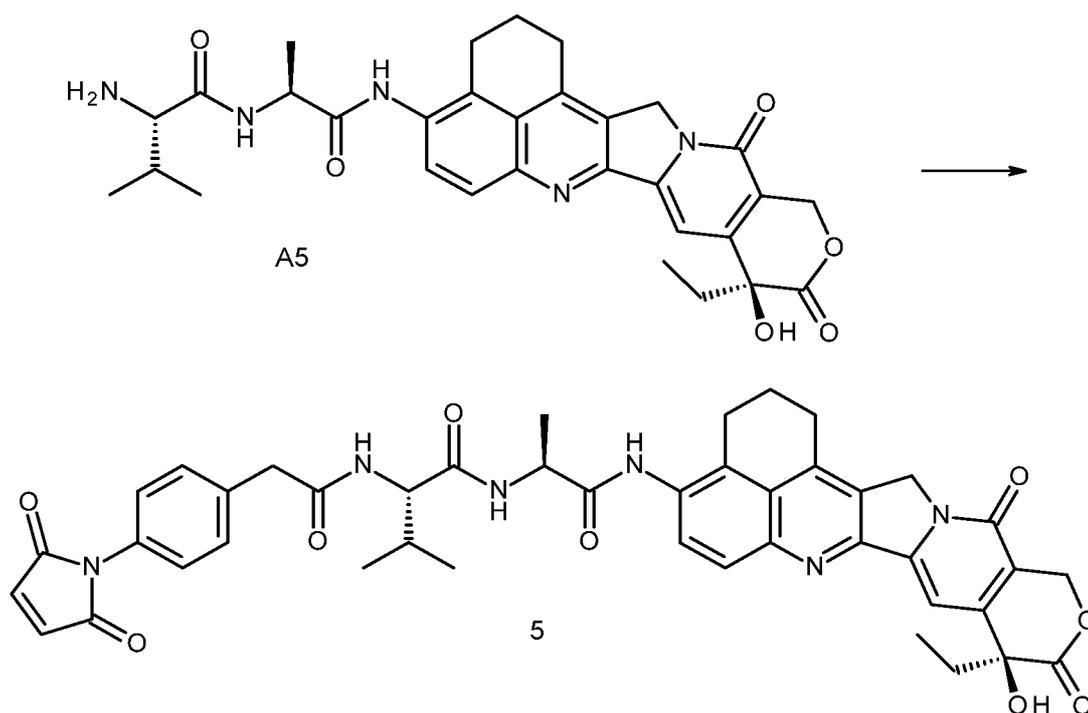
## Пример синтеза 4



N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-4,7,10,13,16-пентаоксанадек-18-инамид (**4**)

**[0651]** Пропаргил-dPEG<sub>5</sub>-кислоту (56 мг, 0,19 ммоль) и EDCI.HCl (37 мг, 0,19 ммоль) добавляли к раствору неочищенного **A5** (расчетное количество 0,19 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли дополнительные 0,5 экв. пропаргил-dPEG<sub>5</sub>-OH и EDCI.HCl. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2 x 50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством препаративной HPLC и фракции подвергали сублимационной сушке с получением чистого **4** (22 мг, выход 16,7% после 2 стадий). LC/MS (способ B): ES<sup>+</sup> = 1,54 мин, *масса/заряд* 860,9 [M + H]<sup>+</sup>. LCMS (способ C): ES<sup>+</sup> = 5,57 мин, *масса/заряд* 860,9 [M + H]<sup>+</sup>.

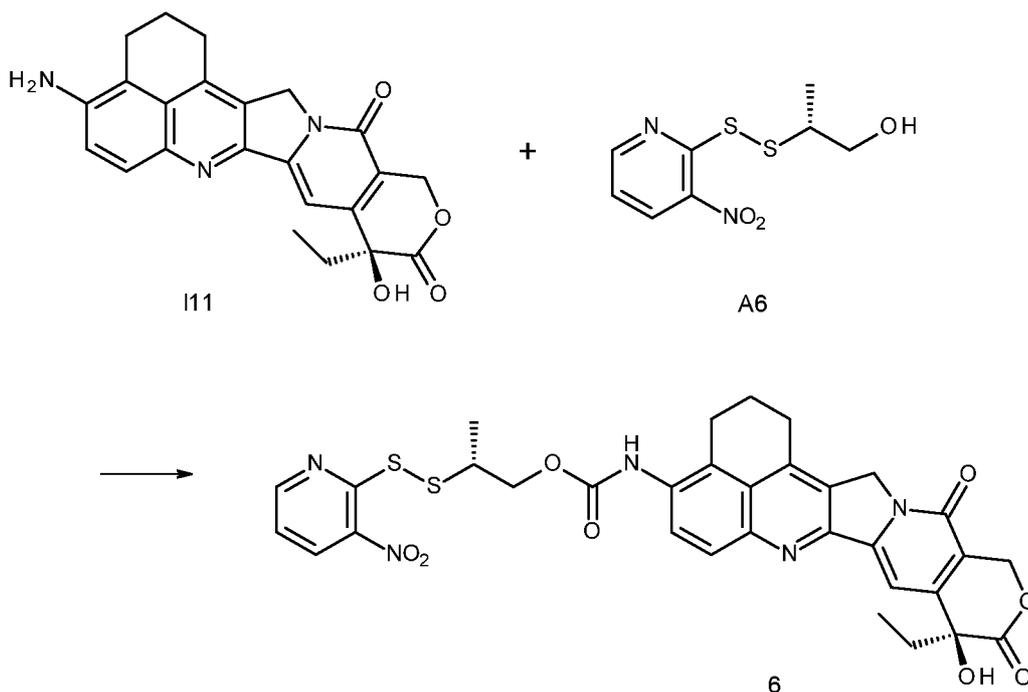
## Пример синтеза 5



(S)-2-(2-(4-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)фенил)ацетамидо)-N-((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид (**5**)

**[0652]** РМ-уксусная кислота-OSu (64 мг, 0,19 ммоль) добавляли к раствору неочищенного **A5** (расчетное количество 0,19 ммоль) в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) в атмосфере аргона. Реакция не протекала, поэтому добавляли DIPEA (51 мкл, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали вплоть до завершения реакции. Смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 50 мл) и солевого раствора, затем сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством препаративной HPLC и фракции подвергали сублимационной сушке с получением чистого **5** (2,5 мг, выход 1,6% после 2 стадий). LC/MS (способ B):  $\text{ES}^+$  = 1,54 мин, *масса/заряд* 787,7  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . LC/MS (способ C):  $\text{ES}^+$  = 5,61 мин, *масса/заряд* 787,8  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

## Пример синтеза 6

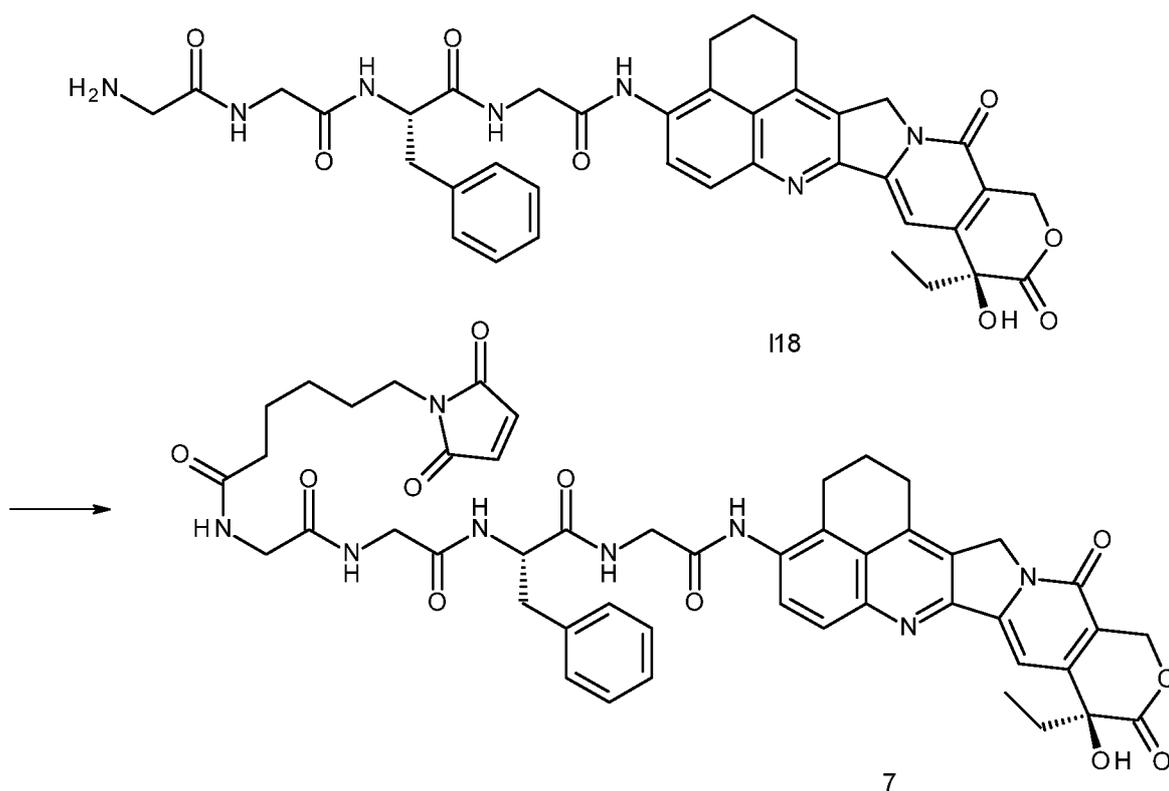


(R)-2-((3-Нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропил-((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)карбамат (**6**)

**[0653]** (i) (2R)-2-[(3-нитро-2-пиридил)дисульфанил]пропан-1-ол **A6** (25 мг, 0,1015 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (1 мл). Добавляли пиридин (8,5 мкл, 0,11 ммоль, 1,0 экв.), затем добавляли трифосген (11 мг, 0,0370685 ммоль, 0,33 экв.) и смесь перемешивали в атмосфере Ar в течение 45 мин, сразу после чего LCMS (гашение с помощью Et<sub>2</sub>NH) указывала на образование соответствующего карбамата.

**[0654]** (ii) (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион (**II1**) (43 мг, 0,09026 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (2 мл), *N,N*-диизопропилэтиламинe (42 мкл, 0,241 ммоль, 2,7 экв.) и пиридине (25 мкл, 0,309 ммоль, 3,4 экв.). Добавляли реакционную смесь из стадии (i) и смесь перемешивали в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и очищали посредством хроматографии с применением Isolera (0–4% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) с получением **6** (22 мг, 0,03256 ммоль, выход 36%, QC = 96,8%) в виде желтого твердого вещества. LC/MS (способ B): RT = 1,86 мин, 676,6 [M+H]<sup>+</sup>.

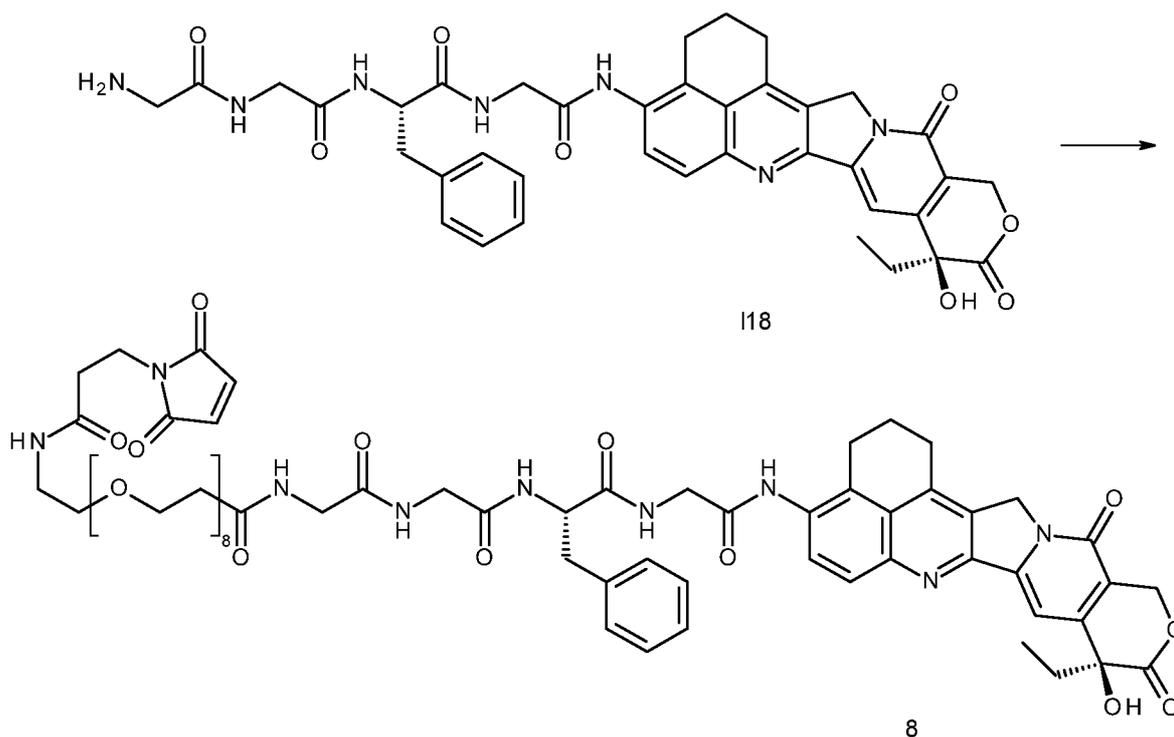
## Пример синтеза 7 (например, синтез SG4052)



6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)гексанамид (7)

**[0655]** Соединение **I18** (259 мг, 0,3588 ммоль) солюбилизировали в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл). Исходный материал был полностью нерастворим, поэтому добавляли DMA (1 мл). Так как улучшения не наблюдали, добавляли DIPEA (68 мкл, 0,390 ммоль) и все твердое вещество перешло в раствор. Добавляли малеимидкапроновую кислоту (69 мг, 0,358 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться при к. т. на протяжении ночи, и после этого анализ LCMS показал завершение реакции. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (2 мл) и обрабатывали вакуумом до сухости. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC и затем подвергали сублимационной сушке с получением соединения **7** в виде коричневатого-желтого твердого вещества (38,2 мг, выход 11%). Аналитические данные: LCMS: 3 мин:  $\text{ES}^+ = 1,47$  мин, *масса/заряд* 916,2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , LCMS: 15 мин:  $\text{ES}^+ = 5,46$  мин, *масса/заряд* 916,1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

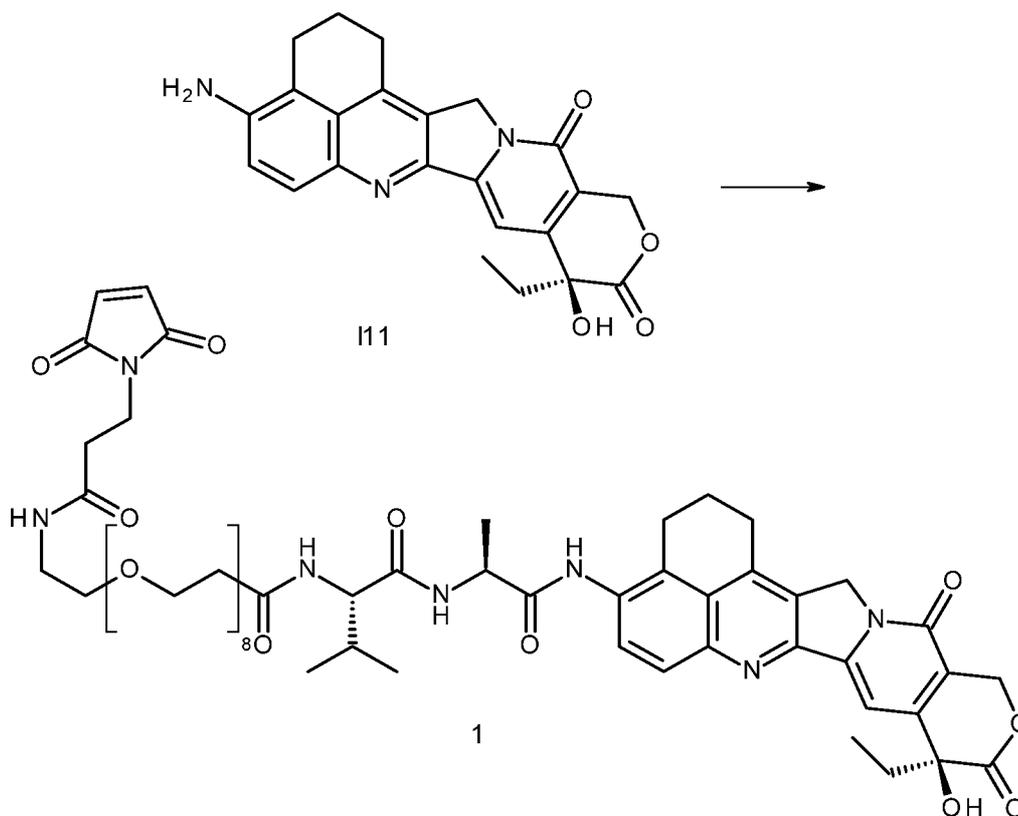
## Пример синтеза 8 (например, синтез SG4057)



1-(3-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-(2-(((S)-1-((2-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-амид (8)

**[0656]** Соединение **118** (70 мг, 0,096 ммоль) солюбилизировали в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл). Исходный материал был полностью нерастворим, поэтому добавляли DMA (0,5 мл). Так как улучшения не наблюдали, добавляли DIPEA (19 мкл, 0,106 ммоль) и все твердое вещество перешло в раствор. Добавляли Mal-dPEG<sub>8</sub>-OH (63 мг, 0,106 ммоль) и EDCI.HCl (19 мг, 0,099 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться при к. т. на протяжении ночи, после чего анализ LCMS показал завершение реакции. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (2 мл) и обрабатывали вакуумом до сухости. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC и затем подвергали сублимационной сушке с получением **8** в виде коричневатого-желтого твердого вещества (30 мг, выход 24%). LCMS: 3 мин:  $\text{ES}^+ = 1,44$  мин, *масса/заряд* 1297,6  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

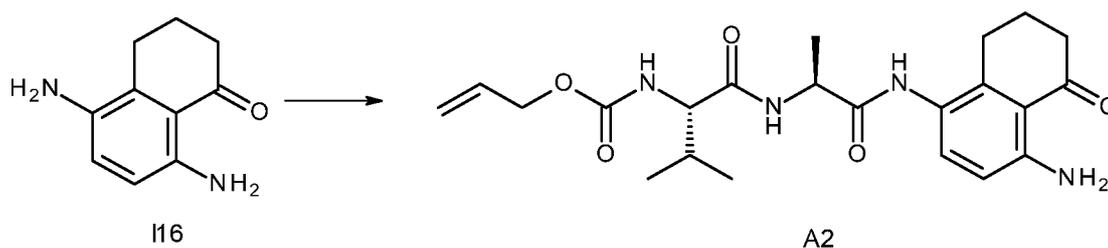
Пример синтеза 9 – альтернативный способ синтеза 1 (например, альтернативный способ синтеза SG3932)



**[0657]** (*S*)-4-Амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10*H*,13*H*-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-10,13-дион **111** (371 мг, 0,779 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (30 мл). Добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (69 мкл, 0,396 ммоль, 0,51 экв.) и (2*S*)-2-[[[(2*S*)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксопиррол-1-ил)пропаноиламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноил amino]-3-метил-бутаноил]амино]пропановую кислоту (664 мг, 0,871 ммоль, 1,1 экв.) в *N,N*-диметилацетамиде (10 мл), затем добавляли EDCI·HCl (226 мг, 1,18 ммоль, 1,5 экв.) и смесь перемешивали в течение 2 ч, сразу после чего LCMS указывала на достаточный уровень превращения, однако отмечалось, что реакция прервалась. Реакционную смесь нагревали до 30°C и перемешивали в течение 30 мин, при этом LCMS указывала на отсутствие изменений, поэтому CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> удаляли *in vacuo* и к полученному раствору в DMA добавляли Et<sub>2</sub>O. Собирали осажденное масло, Et<sub>2</sub>O удаляли *in vacuo* и процесс осаждения повторяли. Объединенные осадки очищали посредством HPLC (10-60% В в А в течение 13 мин) с получением **1** (200 мг, 0,174 ммоль, чистота 98%, выход 22%) в виде желтого остатка после сублимационной сушки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,44 мин (ES+) *масса/заряд* 1149 [M + H]<sup>+</sup>. 1H ЯМР (600 МГц, Хлороформ-*d*) δ 8,81 (s, 1H), 7,83 (s,

2H), 7,48 (s, 1H), 7,18 (dd,  $J = 18,7, 7,5$  Гц, 2H), 6,69 (s, 2H), 6,43 (s, 1H), 5,68 (d,  $J = 16,1$  Гц, 1H), 5,27 (d,  $J = 16,1$  Гц, 1H), 5,03 (d,  $J = 18,4$  Гц, 1H), 4,90 (d,  $J = 18,4$  Гц, 1H), 4,75 (p,  $J = 7,2$  Гц, 1H), 4,32 (dd,  $J = 7,4, 5,8$  Гц, 1H), 4,05 (s, 1H), 3,83 (t,  $J = 7,2$  Гц, 3H), 3,78 – 3,68 (m, 3H), 3,68 – 3,57 (m, 31H), 3,53 (t,  $J = 5,1$  Гц, 3H), 3,40 (q,  $J = 5,3$  Гц, 2H), 3,06 – 2,91 (m, 3H), 2,84 (dt,  $J = 16,3, 6,2$  Гц, 1H), 2,63 (ddd,  $J = 14,8, 8,5, 4,2$  Гц, 1H), 2,57 – 2,44 (m, 4H), 2,30 (dq,  $J = 13,4, 6,7$  Гц, 1H), 2,10 (p,  $J = 6,4$  Гц, 3H), 1,91 (ddt,  $J = 16,8, 14,3, 7,2$  Гц, 3H), 1,54 (d,  $J = 7,1$  Гц, 3H), 1,02 (dd,  $J = 15,5, 6,9$  Гц, 10H).

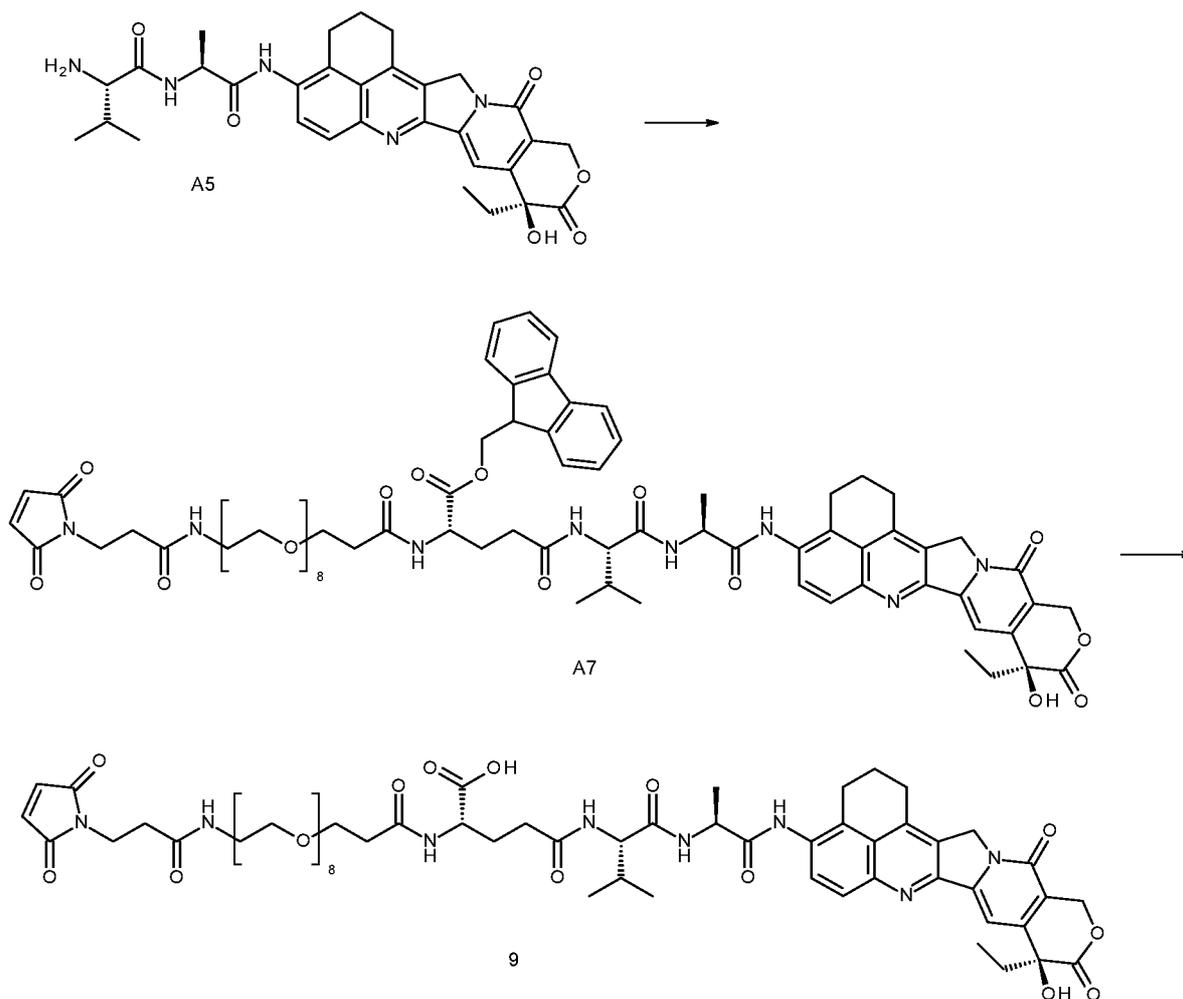
Пример синтеза 10 – альтернативный способ синтеза A2



Аллил-((S)-1-(((S)-1-((4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (**A2**)

**[0658]** EDCI.HCl (7,71 г, 31,2 ммоль) добавляли к раствору alloc-Val-Ala-OH (8,49 г, 31,2 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 мл) и перемешивали в течение 15 мин или до достижения солюбилизации. Затем добавляли **116** (5 г, 28,3 ммоль) и полученную смесь оставляли перемешиваться вплоть до завершения реакции. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт поглощали в Et<sub>2</sub>O (50 мл) и смесь подвергали воздействию ультразвука в течение 3 мин. Твердое вещество фильтровали и снова поглощали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл), подвергали воздействию ультразвука в течение 3 мин и снова фильтровали с получением чистого продукта **A2** в виде серого твердого вещества (12,21 г, выход 79%). LC/MS (способ B): ES<sup>+</sup> = 1,47 мин, масса/заряд 431,5 [M + H]<sup>+</sup>.

## Пример синтеза 11



а) (9H-Флуорен-9-ил)метил-N2-(1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28-октаокса-4-азагентаконтан-31-оил)-N5-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-L-глутаминат (A7)

**[0659]** EDCI.HCl (0,10 ммоль, 1,2 экв.) добавляли к раствору **A5** (0,087 ммоль, 1,0 экв.) и Mal-PEG<sub>8</sub>-Glu-OH (0,10 ммоль, 1,2 экв.) в DCM (5 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Реакционную смесь выпаривали до сухости и очищали с помощью колонки (8–12% MeOH/DCM) с получением продукта в виде белого твердого вещества. Выход = 80 мг (63%). LC/MS (способ В): к. т., 1,66 мин *масса/заряд* (1456,2) M+H.

б) N2-(1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28-октаокса-4-азагентаконтан-31-оил)-N5-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-

бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-L-глутамин (9)

**[0660]** 1-Метилпирролидин (200 мкл) добавляли к раствору **A7** (0,06 ммоль) в DMF (0,8 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Растворитель удаляли под вакуумом и остаток очищали посредством препаративной HPLC (30% MeCN/вода + 0,05% муравьиной кислоты в течение 8,5 минуты). Фракции, содержащие продукт, подвергали сублимационной сушке с получением продукта в виде грязно-белого твердого вещества. Выход = 23 мг (30%). LC/MS (способ В): к. т. 1,43 мин *масса/заряд* (1278,4) M<sup>+</sup>H.

**[0661]** Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в данный документ посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и системы по настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники без отклонения от объема и сущности настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявляемое изобретение не следует чрезмерно ограничивать такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, предполагается, что различные модификации описанных способов осуществления настоящего изобретения, которые очевидны для специалистов в области биохимии и биотехнологии или в смежных областях, входят в объем приведенной ниже формулы изобретения.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Идентификатор	Последовательность
ZY0EPQ-E02; CHDR1	SEQ ID NO: 1: GYYWN
ZY0EPQ-E02; CHDR2	SEQ ID NO: 2: EINHSGSTNYNPSLKS
ZY0EPQ-E02; CHDR3	SEQ ID NO: 3: NLYNWNLDS
ZY0EPQ-E02; CLDR1	SEQ ID NO: 4: RASQGIRNDLG
ZY0EPQ-E02; CLDR2	SEQ ID NO: 5: VASSLQS
ZY0EPQ-E02; CLDR3	SEQ ID NO: 6: LQHNSYPRT
ZY0EQD-E02; CHDR1	SEQ ID NO: 7: GYYWN
ZY0EQD-E02; CHDR2	SEQ ID NO: 8: EINHSGSTSYPNPSLKS
ZY0EQD-E02; CHDR3	SEQ ID NO: 9: VLYNWNVDS
ZY0EQD-E02; CLDR1	SEQ ID NO: 10: RASQDIRNDVG
ZY0EQD-E02; CLDR2	SEQ ID NO: 11: AASRLQS
ZY0EQD-E02; CLDR3	SEQ ID NO: 12: LQHNSYPRT
ZY0EOB-F05; CHDR1	SEQ ID NO: 13: SGGYYWS
ZY0EOB-F05; CHDR2	SEQ ID NO: 14: NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EOB-F05; CHDR3	SEQ ID NO: 15: EKALATVTPSGYENYYTVDV
ZY0EOB-F05; CLDR1	SEQ ID NO: 16: WASQGISSYLA
ZY0EOB-F05; CLDR2	SEQ ID NO: 17: AASTLQS
ZY0EOB-F05; CLDR3	SEQ ID NO: 18: QHLNSYPLT
ZY0EO5-E07; CHDR1	SEQ ID NO: 19: SGGYYWS
ZY0EO5-E07; CHDR2	SEQ ID NO: 20: NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EO5-E07; CHDR3	SEQ ID NO: 21: EKALASVIPSGYENYYVVDV
ZY0EO5-E07; CLDR1	SEQ ID NO: 22: WASQGIAGYLA
ZY0EO5-E07; CLDR2	SEQ ID NO: 23: AASTLQS
ZY0EO5-E07; CLDR3	SEQ ID NO: 24: QHLNSYPLT
ZY0EP0-C07; CHDR1	SEQ ID NO: 25: DYYMS
ZY0EP0-C07; CHDR2	SEQ ID NO: 26: YISSSGSTIYYTDSVKG
ZY0EP0-C07; CHDR3	SEQ ID NO: 27: DGVGFDY
ZY0EP0-C07; CLDR1	SEQ ID NO: 28: RASQSVSSSYLA
ZY0EP0-C07; CLDR2	SEQ ID NO: 29: AASSRAT
ZY0EP0-C07; CLDR3	SEQ ID NO: 30: QQYGSSPLYT

**SEQ ID NO: 31 (ZY0EPQ-E02, переменная область тяжелой цепи)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN

YNPSLKSRVTILVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNLYNWNLDSWGQGLTVTVS  
S

**SEQ ID NO: 32 (ZY0EPQ-E02, переменная область легкой цепи)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYVASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 33 (ZY0EQD-E02, переменная область тяжелой цепи, например, перед модифицированием путем обратной мутации к зародышевому типу)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVTVS  
S

**SEQ ID NO: 34 (ZY0EQD-E02, переменная область легкой цепи)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP  
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 35 (ZY0EOB-F05, переменная область тяжелой цепи)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSISSGGYYWSWIRQHHPGKGLEWIGNIYYSGSTY  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCATEKALATVTPSGYENYYTVDV  
WGQGTITVTVSS

**SEQ ID NO: 36 (ZY0EOB-F05, переменная область легкой цепи)**

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 37 (ZY0EO5-E07, переменная область тяжелой цепи)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISISSGGYYWSWIRQHHPGKGLEWIGNIYYSGSTY  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKALASVIPSGYENYYVVDV  
WGQGTITVTVSS

**SEQ ID NO: 38 (ZY0EO5-E07, переменная область легкой цепи)**

DIQLTQSPSFLSASVGGRVTITCWASQGIAGYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 39: (ZY0EP0-C07, переменная область тяжелой цепи)**

QVQLVESGGVLVKPGSLRLSCAASGFTLSDYYMSWIRQAPGMGLEWVSYISSSGSTIY  
YTDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGVGFDYWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 40 (ZY0EP0-C07, переменная область легкой цепи)**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQSPRLIYAASSRATGIPD  
RFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 41 (константная область тяжелой цепи Maia, вставка цистеина выделена):**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTEFPAVLQSS  
 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
 KSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 42 (константная область легкой цепи)**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 43 (ZY0EQD-E02, переменная область тяжелой цепи, например, перед  
 модифицированием путем обратной мутации к зародышевому типу, например  
 вариант под SEQ ID NO: 33/SEQ ID NO: 45)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGRGLEWIGEINHSGSTSY  
 NPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLLTVSS

**SEQ ID NO: 44 (ZY0EQD-E02, легкая цепь):**

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNDVGVYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP  
 SRFGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 45 (EQD-E02\_GL, переменная область тяжелой цепи, GL =  
 зародышевая)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS  
 YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLLTVSS  
 S

**SEQ ID NO: 46 (EQD-E02-GLY, переменная область тяжелой цепи, GLY =  
 полученная путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Y)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGSTS  
 YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLLTVSS  
 S

**SEQ ID NO: 47 (EQD-E02-GLQ, переменная область тяжелой цепи, GLQ =  
 полученные путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Q)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGSTS  
 YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLLTVSS  
 S

**SEQ ID NO: 48 (E02-GL-Maia-тяжелая цепь, вставка цистеина выделена)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS  
 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS  
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 49 (E02-GLY-Maia-тяжелая цепь, GLY = полученные путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Y)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEYHSGSTS  
 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS  
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 50 (E02-GLQ-Maia-тяжелая цепь, GLQ = полученные путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Q)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEQHSGSTS  
 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS  
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 51 (E02-GL-WT-тяжелая цепь)**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS  
 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS  
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 52 (константная область тяжелой цепи)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 53 (последовательность нуклеиновой кислоты В7Н4 человека, включая 5'- и 3'-UTR)**

GCCACCatggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgactcatcattggctt  
tggtatttcagggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcactttgaacc  
tgacatcaactttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaagaaggcaaatgagctgtcg  
gagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtggttctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaactgcaact  
cacagatgctggcacctacaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgcc  
ggaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggtccccagcccacagtggtctgggcatcc  
caagtgaccagggagccaacttctcgaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaagggtgtgtctgtctct  
acaatgttacgatcaacaacatactcctgtatgattgaaatgacattgccaaagcaacaggggatcaaatgacagaatcggagatc  
aaaaggcggagtcactacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtctctcttctttgccatcagctgggcacttctcctctcagccct  
tacctgatgctaaaaTAATAA

**SEQ ID NO: 54 (последовательность нуклеиновой кислоты В7Н4 человека, кодирующая последовательность)**

atggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgactcatcattggctttggtatttcag  
ggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcactttgaaactgacatcaaa  
ctttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaagaaggcaaatgagctgtcggagcaggat  
gaaatgttcagaggccggacagcagtggttctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaactgcaactcagatgct  
ggcacctacaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaat  
gtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggtccccagcccacagtggtctgggcatcccaagttgacc  
aggagccaacttctcgaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaagggtgtgtctgtctctacaatgttac  
gatcaacaacatactcctgtatgattgaaatgacattgccaaagcaacaggggatcaaatgacagaatcggagatcaaaaggcgg  
agtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtctctcttctttgccatcagctgggcacttctcctctcagcccttacctgatgct  
aaaa

**SEQ ID NO: 55 (полипептидная последовательность В7Н4 человека; номер доступа в UniProt: Q7Z7D3)**

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS  
 IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTD  
 AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPOPTVVWA  
 SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT  
 ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

### ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

E1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с B7-H4, содержащие:

- i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
- ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
- iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
- iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
- v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.

E2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с E1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - ii. вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - iii. вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - iv. вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - v. вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - vi. VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно или их функциональный вариант;
  - vii. VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно или их функциональный вариант;
  - viii. VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 соответственно или их функциональный вариант;
- или
- ix. VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно или их функциональный вариант.

E3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с E1 или E2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант.

E4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с E1-E3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- i. VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант.

Е5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с Е1-Е4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают линию клеток OVCAR4.

Е6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с Е1-Е5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

Е7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с Е1-Е5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

Е8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с Е1-Е7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

Е9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из Е1-Е5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

Е10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из Е1-Е5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

Е11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из Е1-Е10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с гетерологичным средством.

Е12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из Е1-Е11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими гетерологичными средствами, выбранными из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулизина, пирролобензодиазепина, противомикробного средства, терапевтического средства, пролекарства, пептида, белка, фермента, липида, модификатора биологического ответа, фармацевтического средства, лимфокина, гетерологичного антитела, фрагмента гетерологичного антитела, выявляемой метки, полиэтиленгликоля (PEG), радиоактивного изотопа, или их комбинацией.

Е13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из Е1-Е12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими гетерологичными средствами, выбранными из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулизина, пирролобензодиазепина, или их комбинацией.

E14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с гетерологичным средством, выбранным из группы, состоящей из тубулина AZ1508, пирролобензодиапезина SG3315, пирролобензодиапезина SG3249, или их комбинацией.

E15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249: (SG3249).

E16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с (SG3932); (SG4010); (SG4057) и/или (SG4052).

E17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E14 или E16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с (SG3932).

E18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E17, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

E19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E18, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизованное моноклональное антитело.

E20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E19.

E21. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E19.

E22. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по E21.

E23. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с B7-H4, включающий обеспечение экспрессии полинуклеотида в соответствии с E22 в клетке-хозяине.

E24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, получаемые с помощью способа по E23.

E25. Способ лечения рака, предусматривающего раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4, при этом способ включает введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из E1-E19 или E24, фармацевтической композиции по E20 или их комбинации.

E26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из E1-E19 или 24 или фармацевтическая композиция по E20 для применения в лечении рака, где указанный рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4.

E27. Способ в соответствии с E25 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения в соответствии с E26, где указанный рак выбран из рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточной и/или аденокарциномы), рака поджелудочной железы и рака желудка.

E28. Способ или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения в соответствии с любым из E25-E27, где указанный рак выбран из рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия и холангиокарциномы.

E29. Способ или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения в соответствии с любым из E25-E28, где указанный рак представляет собой рак молочной железы, выбранный из положительного по гормональным рецепторам (HR+) рака молочной железы, положительного по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (HER2+) рака молочной железы и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

E30. Способ выявления присутствия или отсутствия полипептида B7-H4 в образце, включающий:

- i. приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с любым из E1-E19 или E24 или фармацевтической композицией в соответствии с E20 с обеспечением получения комплекса антитело-антиген;
- ii. выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса антитело-антиген;
- iii. при этом присутствие комплекса антитело-антиген подтверждает присутствие полипептида B7-H4;
- iv. при этом отсутствие комплекса антитело-антиген подтверждает отсутствие полипептида B7-H4.

E31. Способ в соответствии с E30, где присутствие указанного комплекса антитело-антиген является признаком присутствия раковой клетки, и где отсутствие указанного комплекса антитело-антиген является признаком отсутствия раковой клетки.

E32. Способ в соответствии с E30 или E31, где образец представляет собой выделенный образец, получаемый от субъекта.

Е33. Способ в соответствии с любым из Е30-Е32, где полипептид В7-Н4 является составным компонентом раковой клетки.

Е34. Конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий:

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с В7-Н4 человека, содержащие HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12;

(ii) линкер и

(iii) цитотоксическое средство, где цитотоксическое средство представляет собой SG3932,

при этом в ADC соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) составляет 8.

Е35. ADC по Е34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой (VH) цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой (VL) цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

Е36. ADC по Е34 или Е35, содержащий тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

Е37. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC по любому из Е34-Е37.

Е38. Способ лечения рака, предусматривающего раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4, при этом способ включает введение субъекту ADC по любому из Е34-Е37 или фармацевтической композиции по Е37 или их комбинации.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с B7-H4, содержащие:
  - i. CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант;
  - ii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;
  - iii. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно или их функциональный вариант;
  - iv. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24 соответственно или их функциональный вариант; или
  - v. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно или их функциональный вариант.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
  - i. переменную область тяжелой (VH) цепи и переменную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - ii. переменную область тяжелой (VH) цепи и переменную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - iii. переменную область тяжелой (VH) цепи и переменную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;

- iv.     вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - v.     вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;
  - vi.     VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно или их функциональный вариант;
  - vii.    VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно или их функциональный вариант;
  - viii.   VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 соответственно или их функциональный вариант; или
  - ix.     VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно или их функциональный вариант.
3.    Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
- i.     HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 соответственно или их функциональный вариант.
4.    Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:
- i.     VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант.
5.    Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают линию клеток OVCAR4.
6.    Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную

область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с гетерологичным средством.

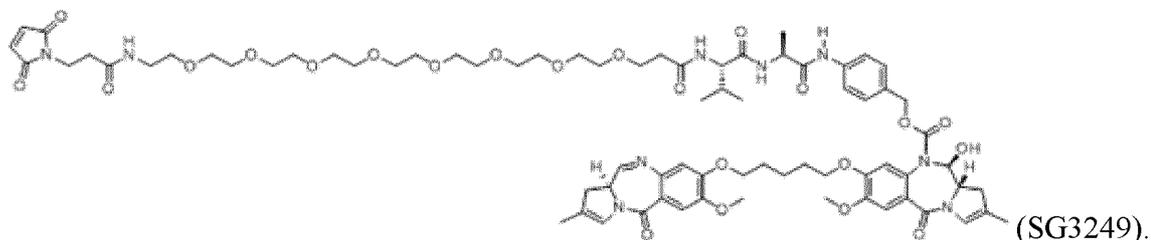
12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими гетерологичными средствами, выбранными из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулина, пирролобензодиазепина, противомикробного средства, терапевтического средства, пролекарства, пептида, белка, фермента, липида, модификатора биологического ответа, фармацевтического средства, лимфокина, гетерологичного антитела, фрагмента гетерологичного антитела, выявляемой метки, полиэтиленгликоля (PEG), радиоактивного изотопа или их комбинации.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими гетерологичными средствами, выбранными из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулина, пирролобензодиазепина или их комбинации.

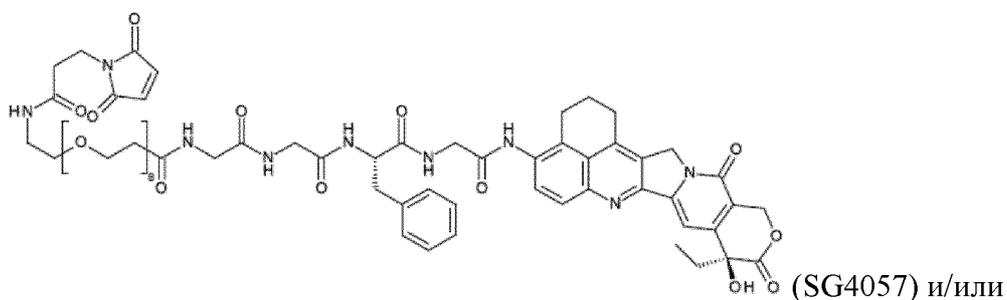
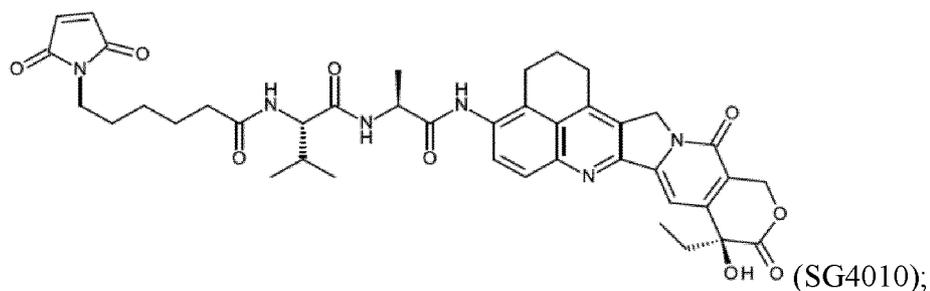
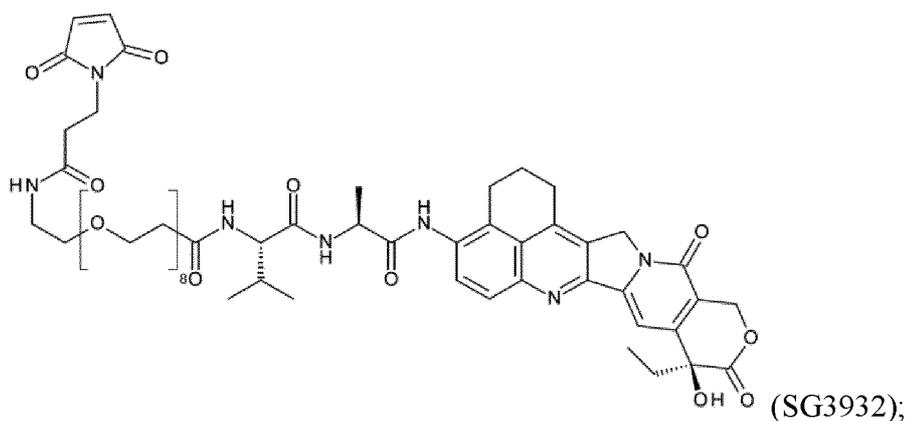
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с

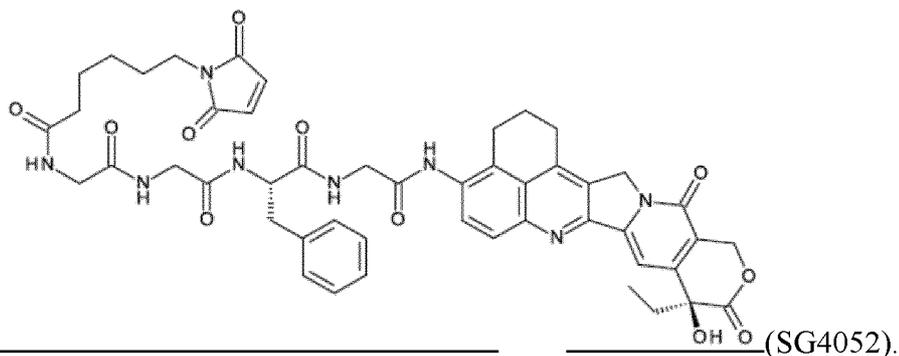
гетерологичным средством, выбранным из группы, состоящей из тубулина AZ1508, пирролобензодиапезина SG3315, пирролобензодиапезина SG3249 или их комбинации.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином, представляющим собой пирролобензодиапезин SG3249:

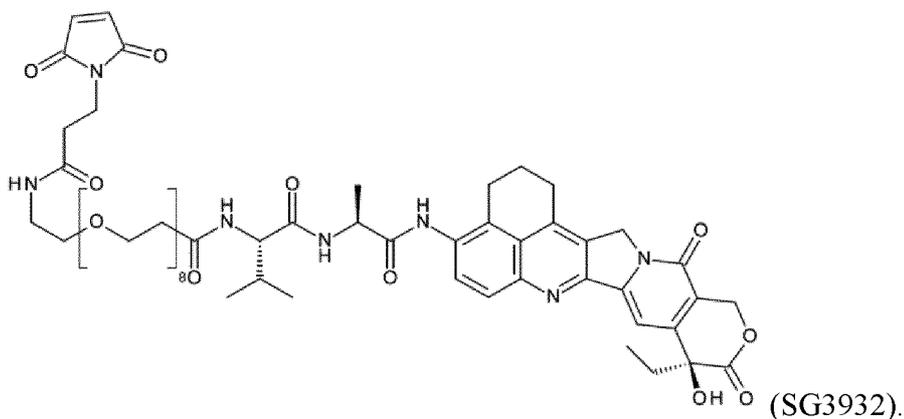


16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с





17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14 или п. 16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с



18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизированное моноклональное антитело.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов.

21. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19.

22. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 21.

23. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с В7-Н4, включающий обеспечение экспрессии полинуклеотида по п. 22 в клетке-хозяине.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, получаемые с помощью способа по п. 23.

25. Способ лечения рака, предусматривающего раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4, при этом способ включает введение субъекту антитела или антигенсвязывающего

фрагмента по любому из пп. 1-19 или п. 24, фармацевтической композиции по п. 20 или их комбинации.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19 или п. 24 или фармацевтическая композиция по п. 20 для применения в лечении рака, где указанный рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4.

27. Способ по п. 25 или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения по п. 26, где указанный рак выбран из рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточной и/или аденокарциномы), рака поджелудочной железы и рака желудка.

28. Способ или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения по любому из пп. 25-27, где указанный рак выбран из рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия и холангиокарциномы.

29. Способ или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция, предназначенные для применения по любому из пп. 25-28, где указанный рак представляет собой рак молочной железы, выбранный из положительного по гормональным рецепторам (HR+) рака молочной железы, положительного по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (HER2+) рака молочной железы и трижды отрицательного рака молочной железы (TNBC).

30. Способ выявления присутствия или отсутствия полипептида В7-Н4 в образце, включающий:

- i. приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-19 или п. 24 или фармацевтической композицией по п. 20 с обеспечением получения комплекса антитело-антиген;
- ii. выявление присутствия или отсутствия указанного комплекса антитело-антиген;
- iii. при этом присутствие комплекса антитело-антиген подтверждает присутствие полипептида В7-Н4;
- iv. при этом отсутствие комплекса антитело-антиген подтверждает отсутствие полипептида В7-Н4.

31. Способ по п. 30, где присутствие указанного комплекса антитело-антиген является признаком присутствия раковой клетки, и где отсутствие указанного комплекса антитело-антиген является признаком отсутствия раковой клетки.

32. Способ по п. 30 или п. 31, где образец представляет собой выделенный образец, получаемый от субъекта.

33. Способ по любому из пп. 30-32, где полипептид В7-Н4 является составным компонентом раковой клетки.

34. Конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий:

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9; и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12;

(ii) расщепляемый линкер mp-PEG8-val-ala и

(iii) цитотоксическое средство, где цитотоксическое средство представляет собой SG3932,

и при этом в ADC соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) составляет приблизительно 8.

35. ADC по п. 34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой (VH) цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой (VL) цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

36. ADC по п. 34 или п. 35, содержащий тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC по любому из пп. 34-37.

38. Способ лечения рака, предусматривающего раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4, при этом способ включает введение субъекту ADC по любому из пп. 34-37 или фармацевтической композиции по п. 37 или их комбинации.

39. Способ по п. 25 или п. 38, где раковая клетка характеризуется наличием дефекта гомологичной репарации ДНК.

40. Способ по п. 39, где дефект гомологичной репарации ДНК определяется присутствием мутации BRCA1.

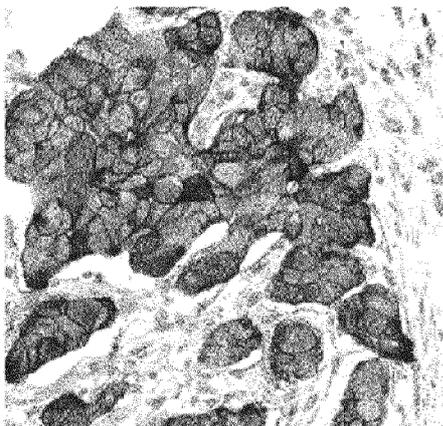
41. Способ по п. 39 или п. 40, где дефект гомологичной репарации ДНК определяется отрицательным баллом в анализе образования очагов RAD51.

42. Способ снижения объема опухоли, которая экспрессирует B7-H4, при этом способ включает введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-19 или п. 24, фармацевтической композиции по п. 20, ADC по любому из пп. 34-37, фармацевтической композиции по п. 37 или их комбинации.

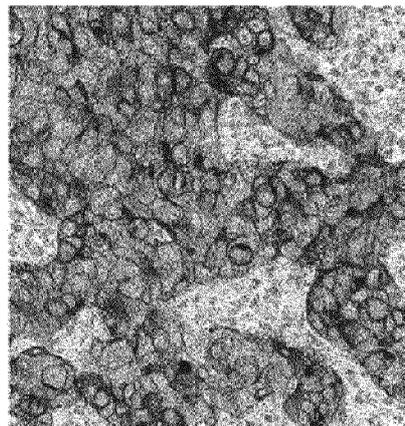
43. Способ по п. 42, где опухоль характеризуется наличием дефекта гомологичной репарации ДНК.

44. Способ по п. 43, где дефект гомологичной репарации ДНК определяется присутствием мутации BRCA1.

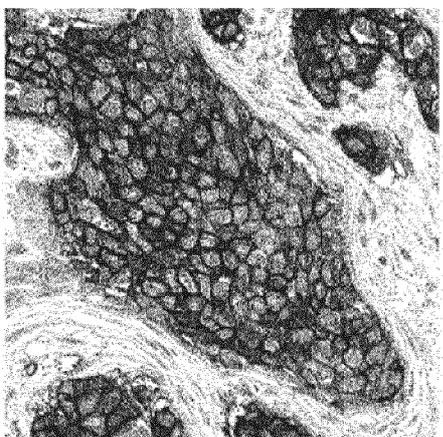
45. Способ по п. 43 или п. 44, где дефект гомологичной репарации ДНК определяется отрицательным баллом в анализе образования очагов RAD51.



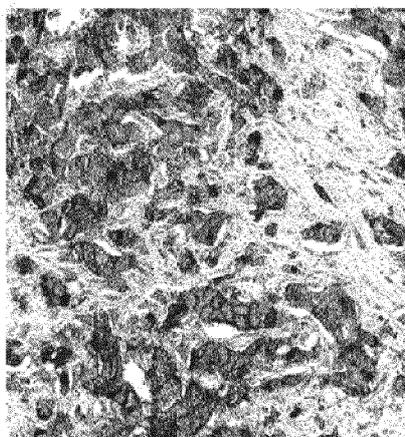
**ФИГ. 1А**



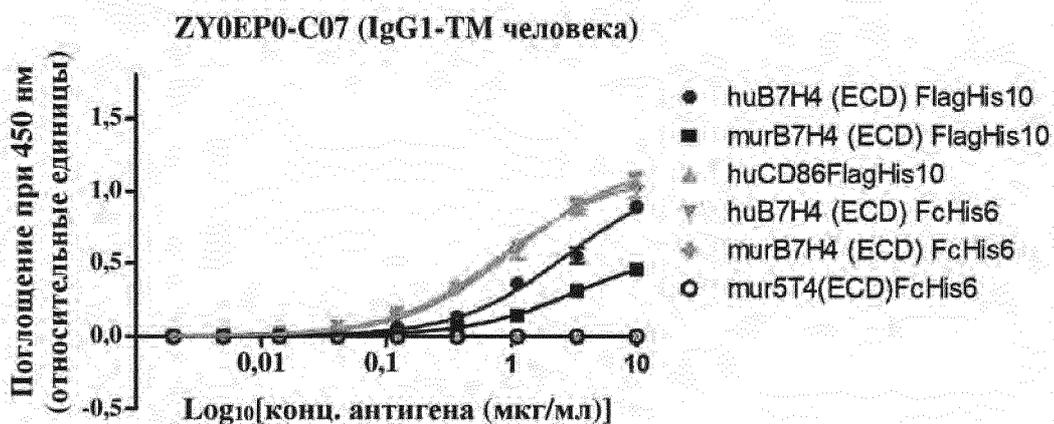
**ФИГ. 1В**



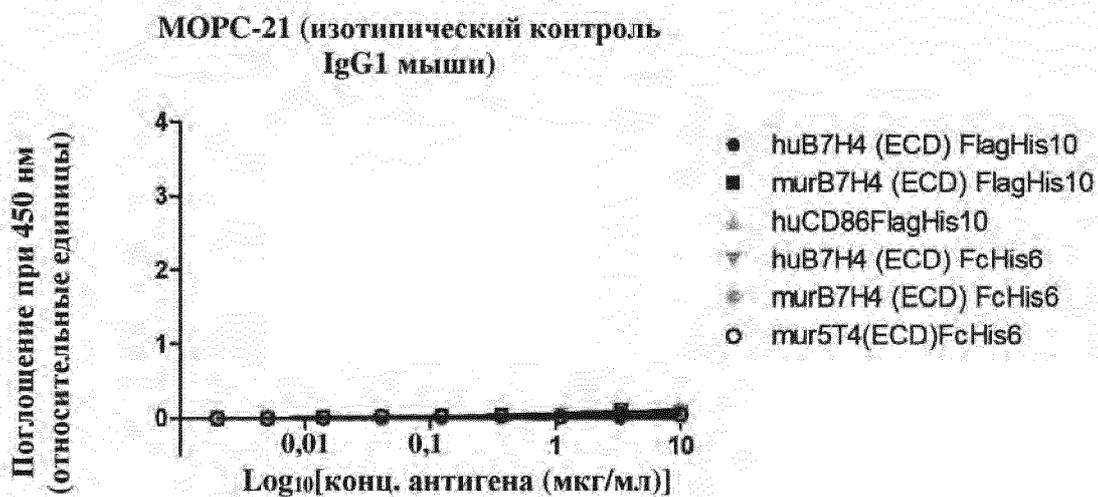
**ФИГ. 1С**



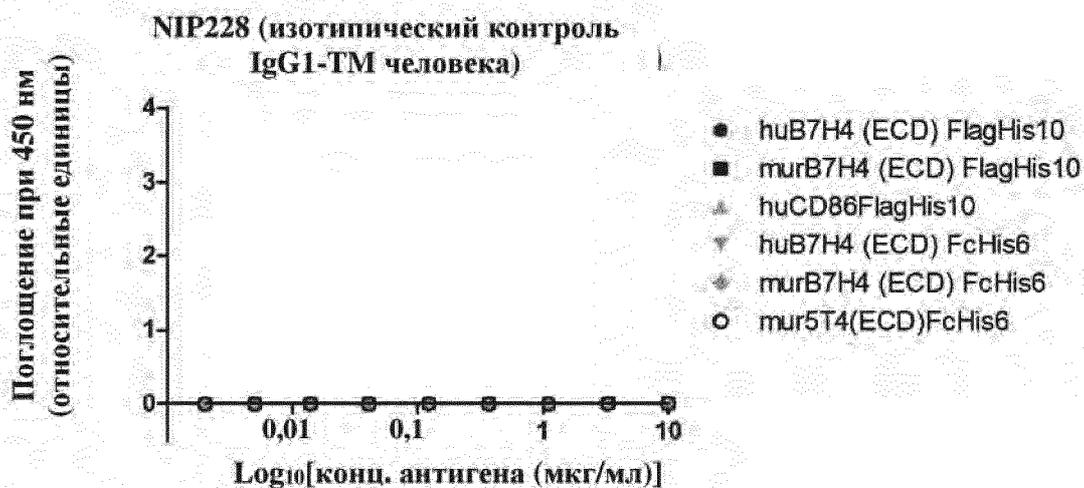
**ФИГ. 1D**



ФИГ. 2А

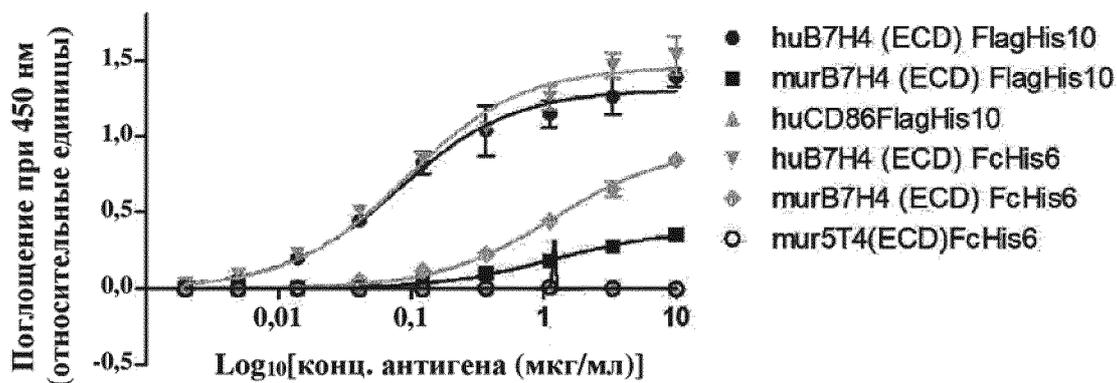


ФИГ. 2В



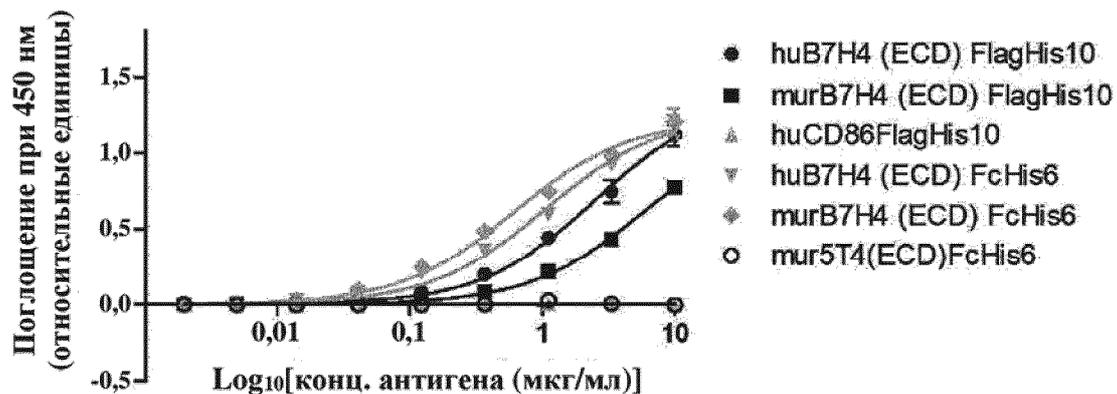
ФИГ. 2С

## ZY0EQD-E02 (IgG1-ТМ человека)



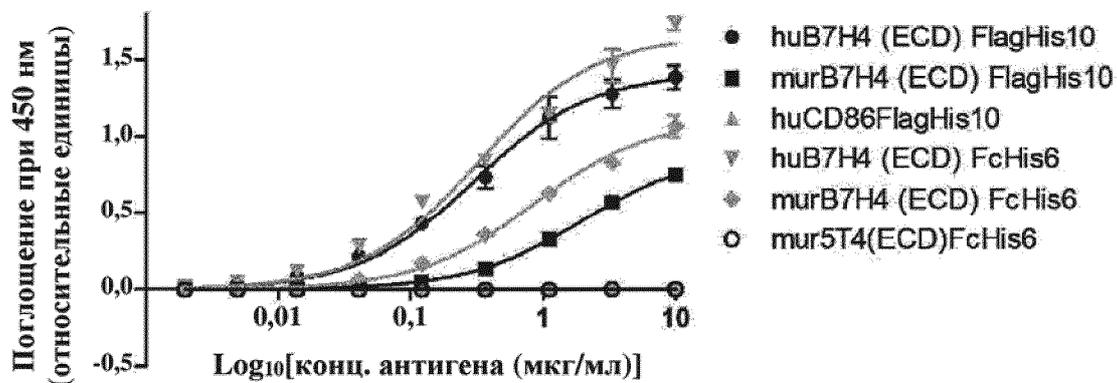
ФИГ. 2D

## ZY0EO5-E07 (IgG1-ТМ человека)



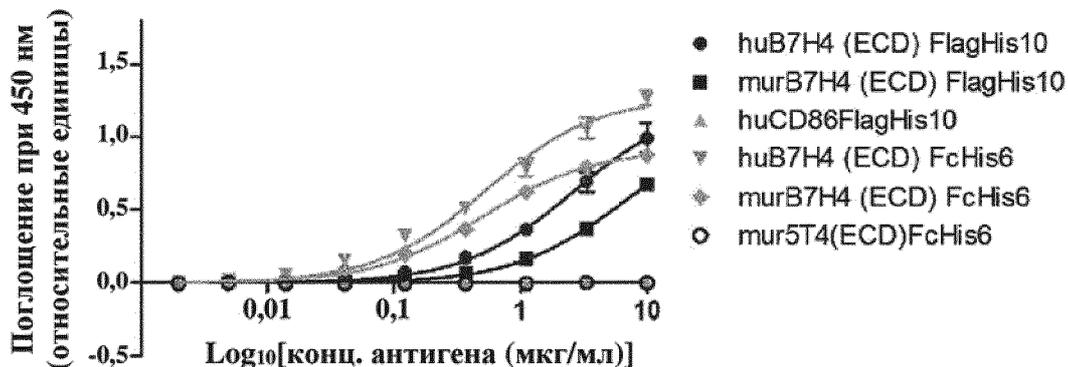
ФИГ. 2E

## ZY0EPQ-E02 (IgG1-ТМ человека)



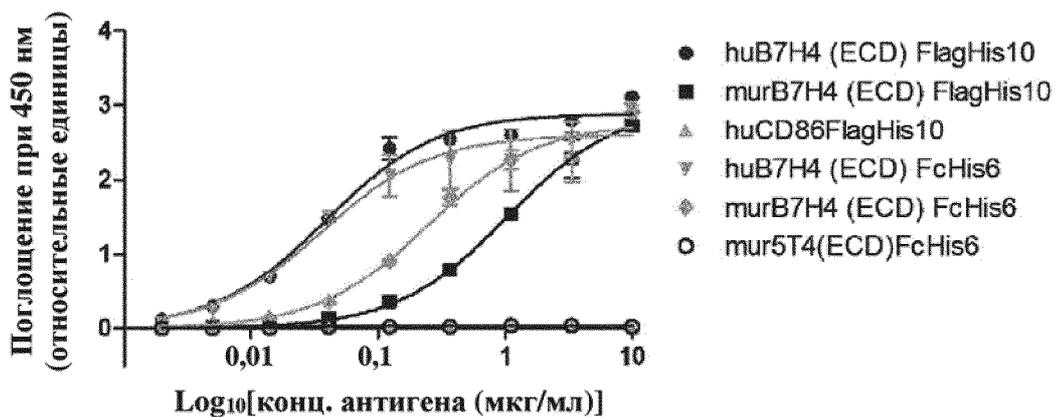
ФИГ. 2F

## ZY0EOB-F05 (IgG1-ТМ человека)



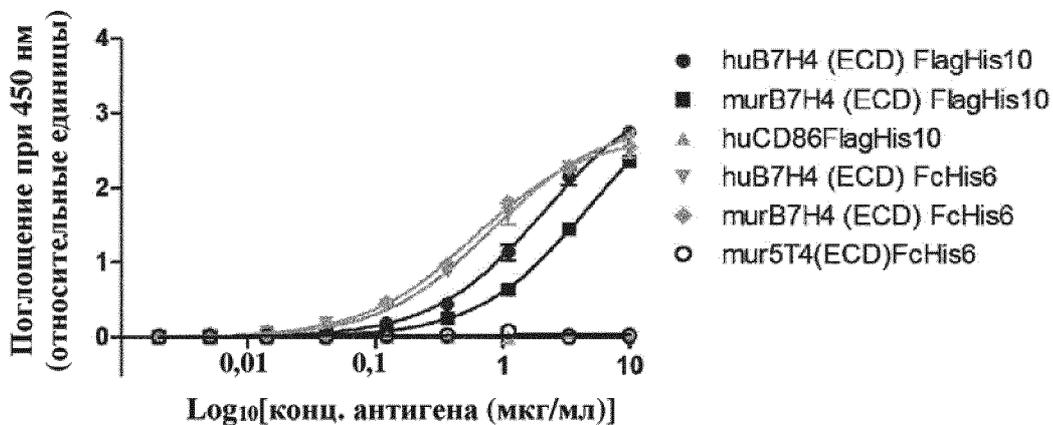
ФИГ. 2G

## ZY0EQD-E02 (IgG1 мыши)

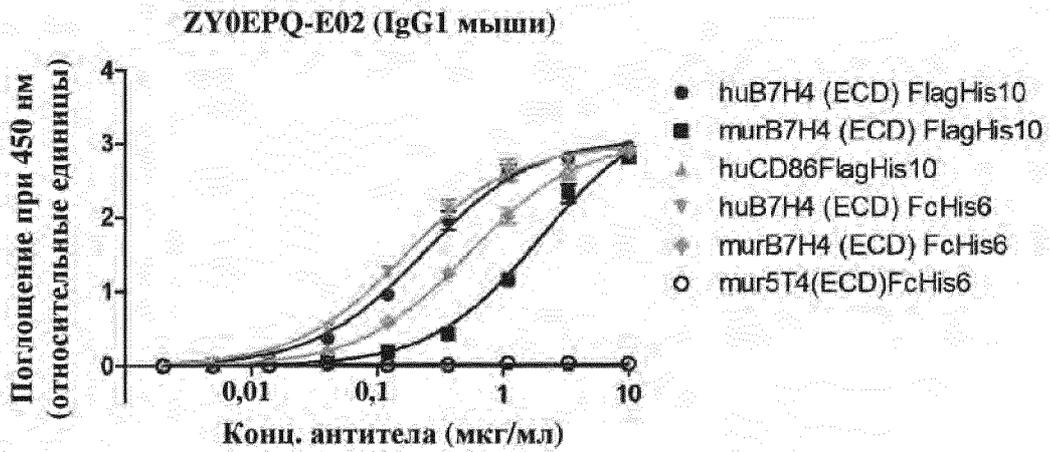


ФИГ. 2H

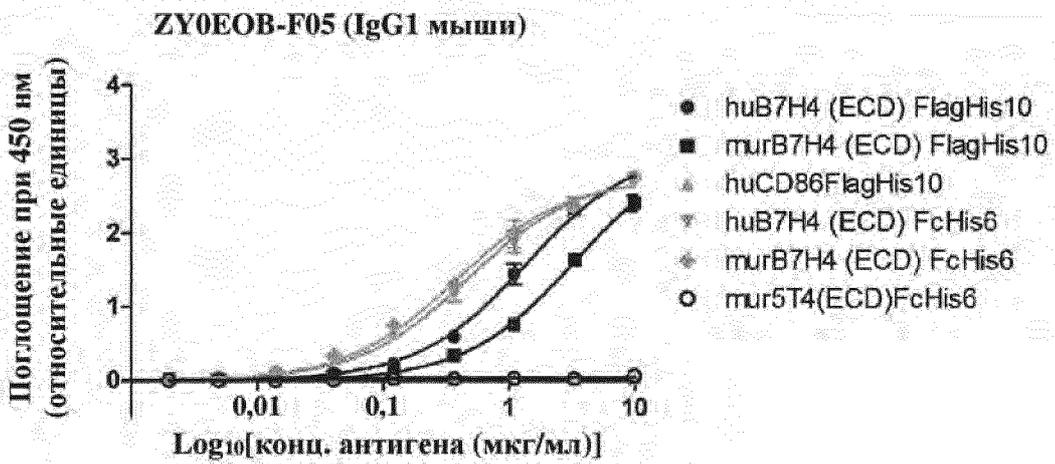
## ZY0EO5-E07 (IgG1 мыши)



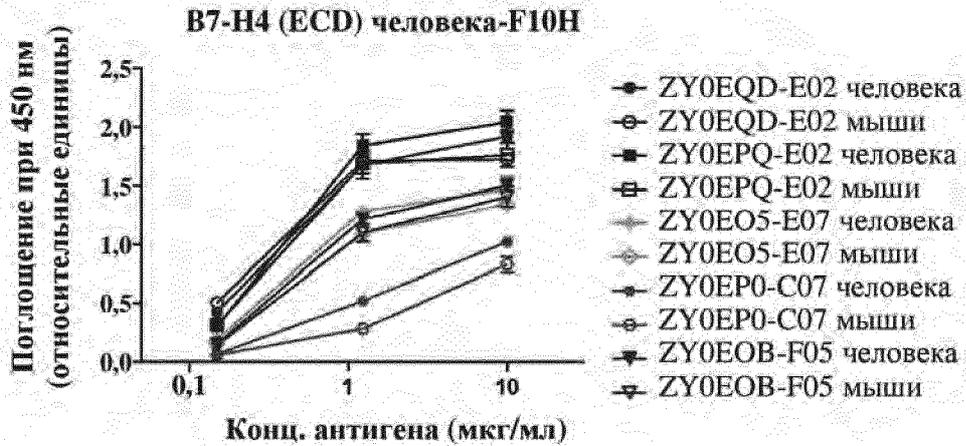
ФИГ. 2I



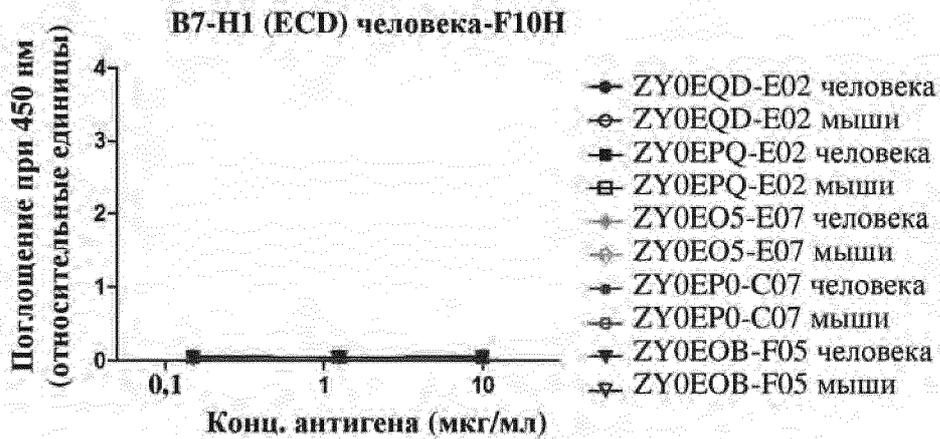
ФИГ. 2J



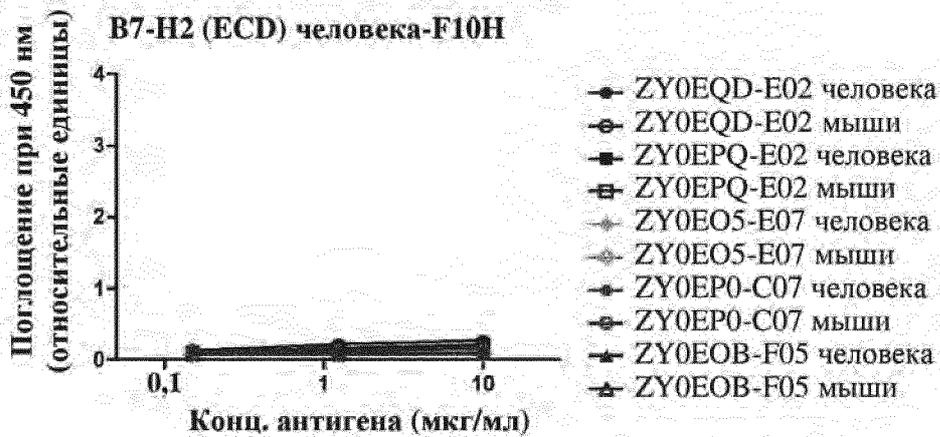
ФИГ. 2К



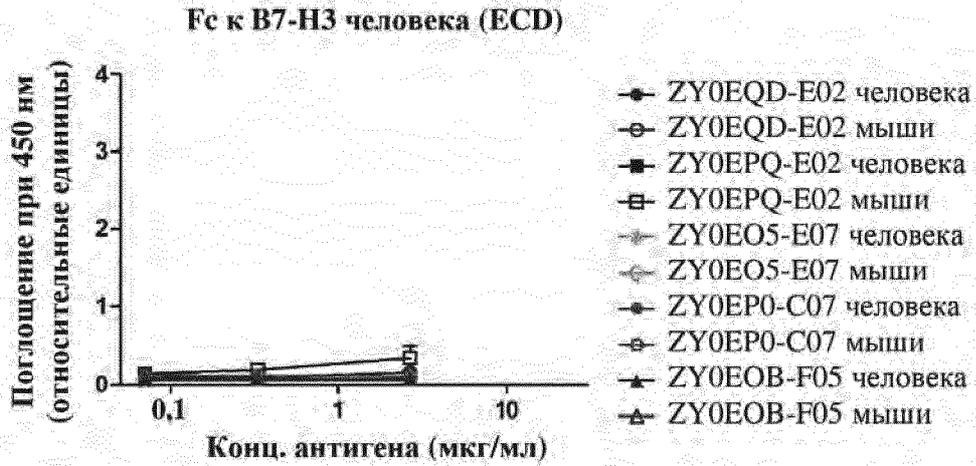
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



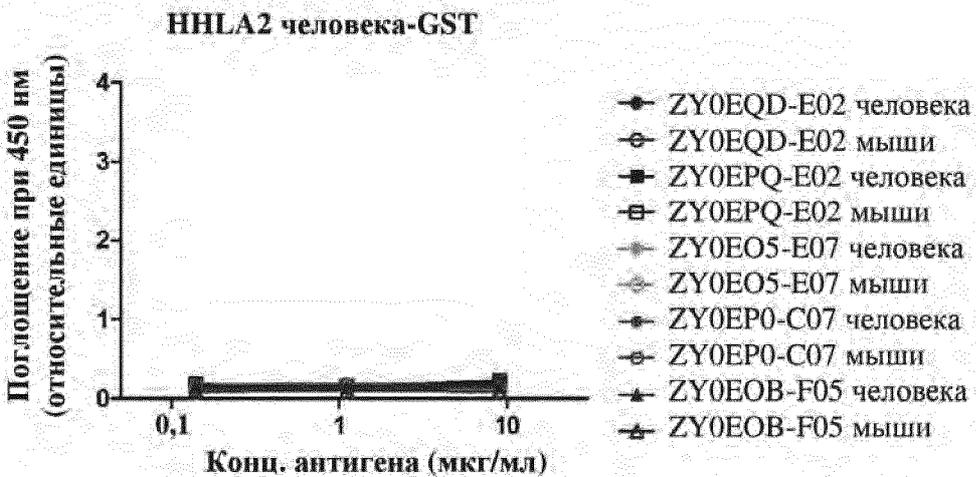
ФИГ. 3С



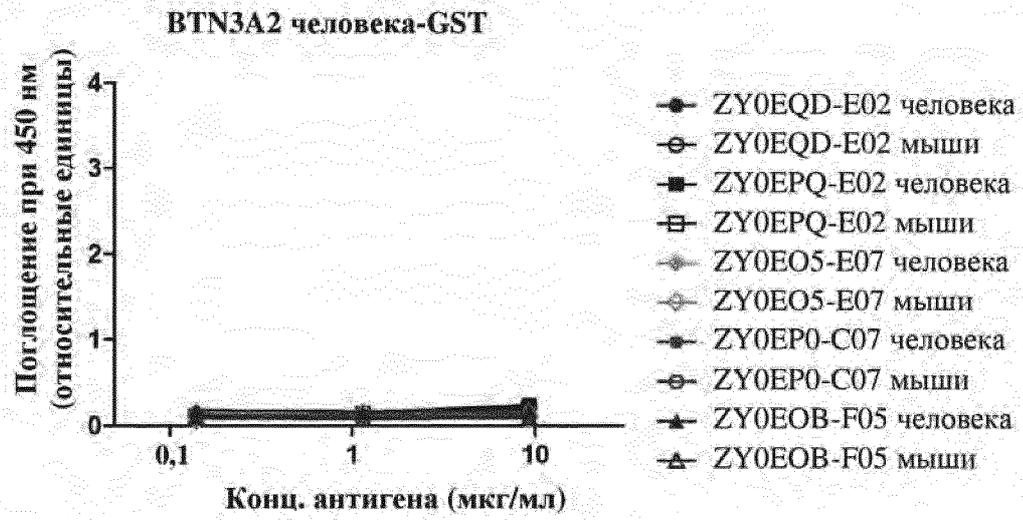
ФИГ. 3D

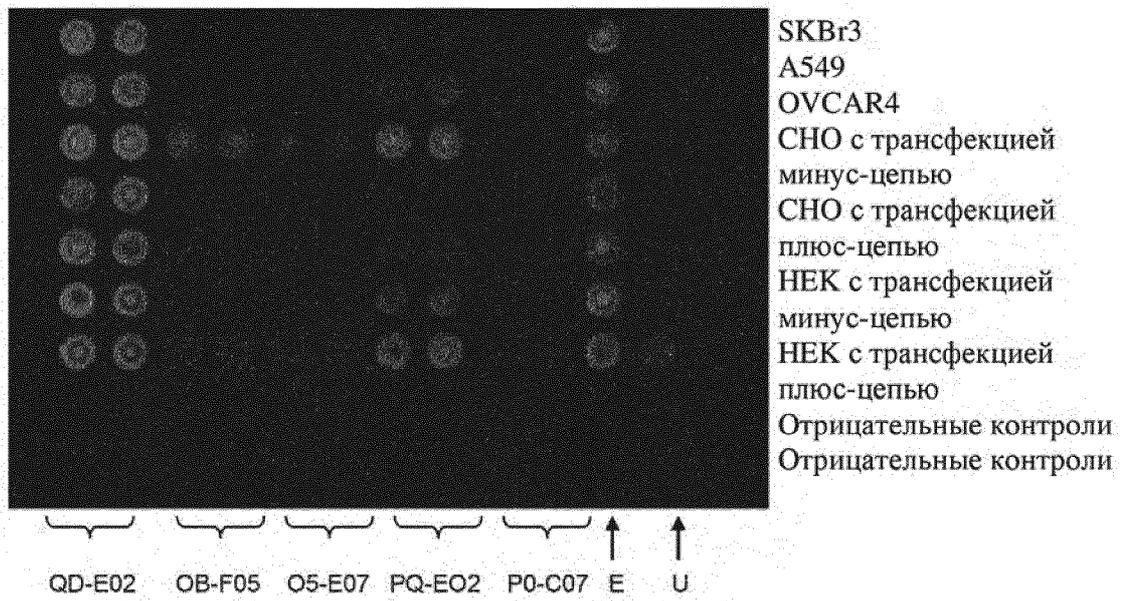


ФИГ. 3E

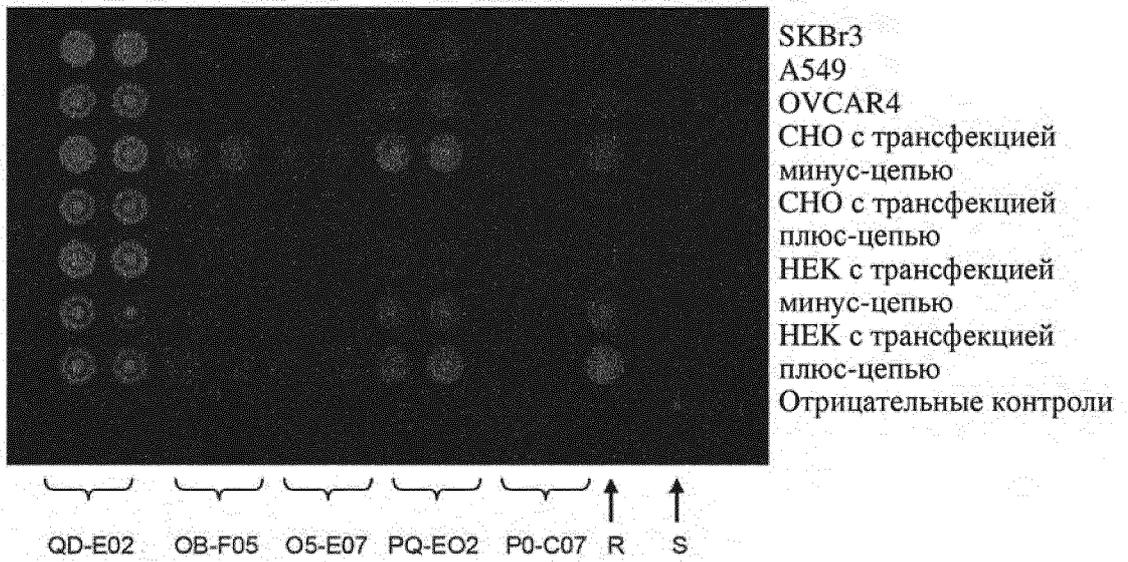


ФИГ. 3F

**ФИГ. 3G**

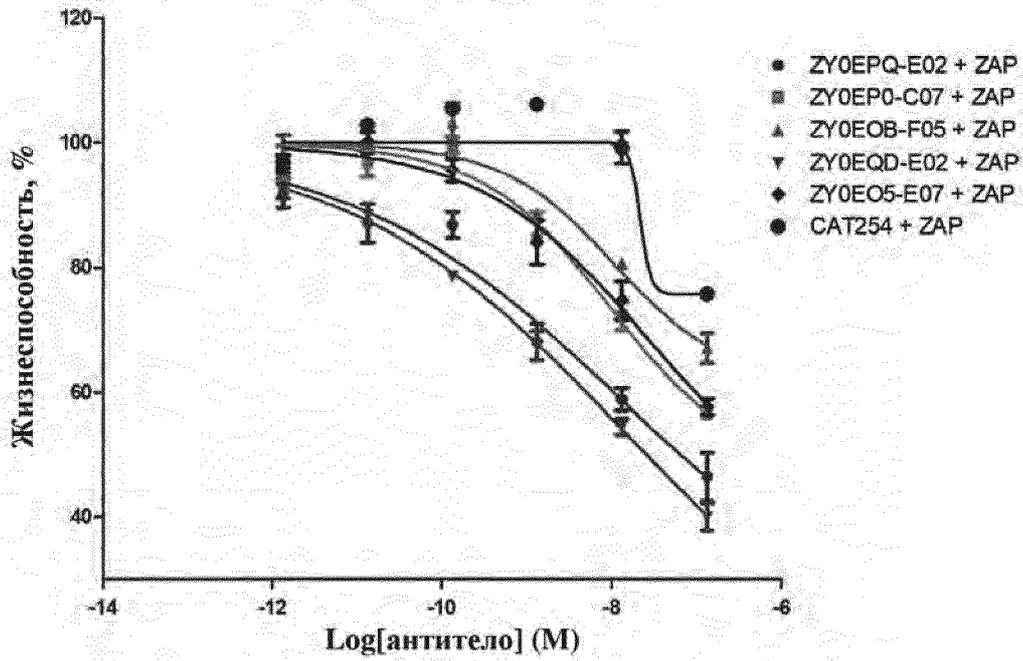


ФИГ. 4А



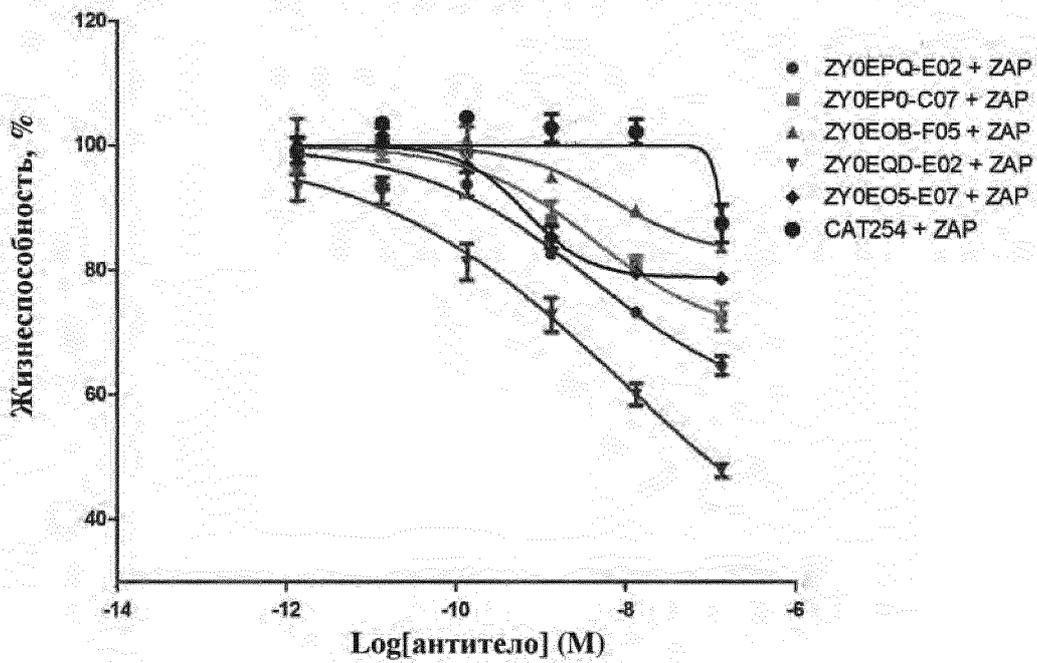
ФИГ. 4В

## ZAP-анализ в OVCAR4



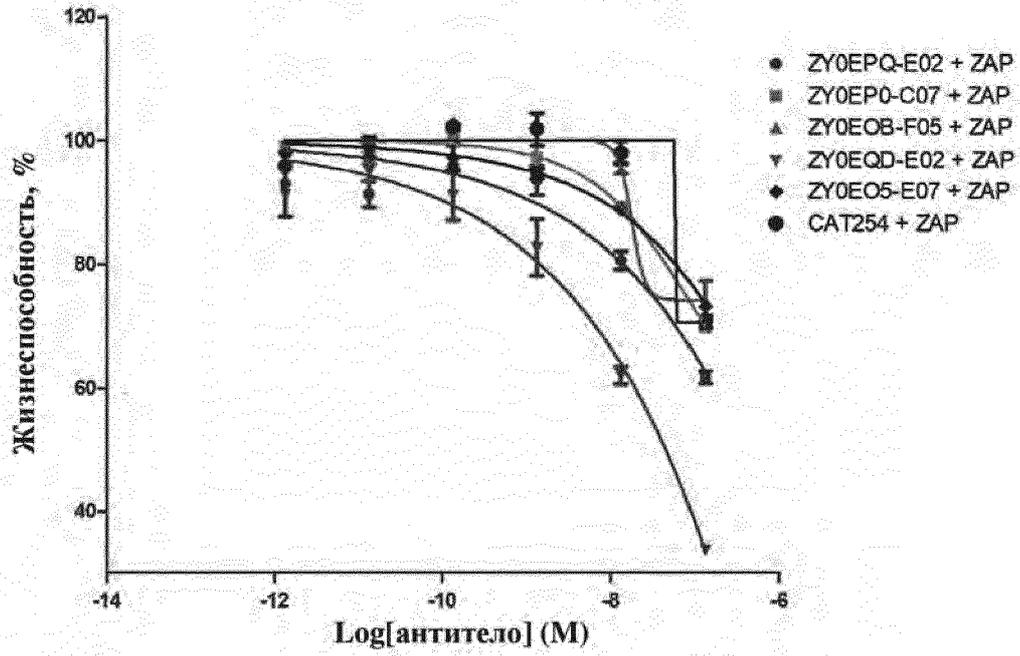
ФИГ. 5А

## ZAP-анализ в SKBr3



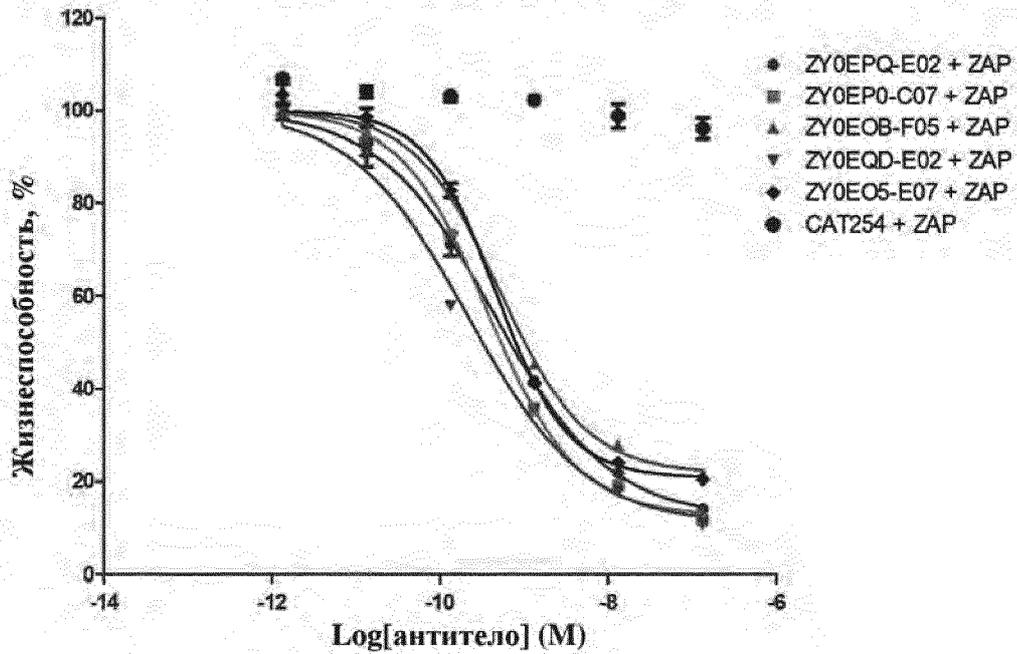
ФИГ. 5В

## ZAP-анализ в MDAMB468

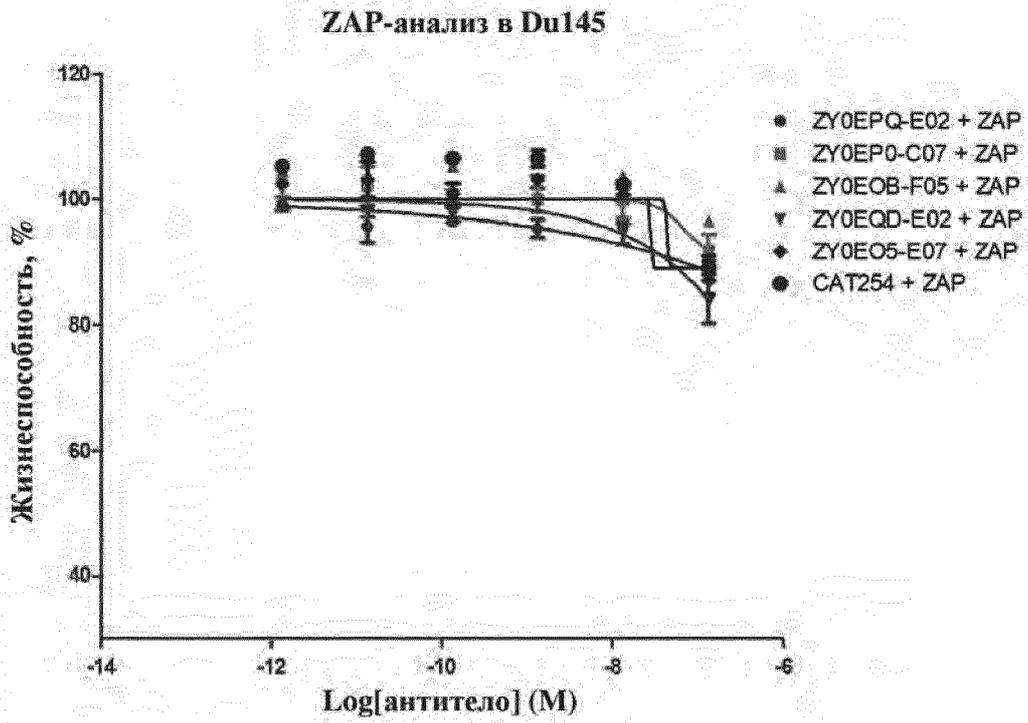


ФИГ. 5C

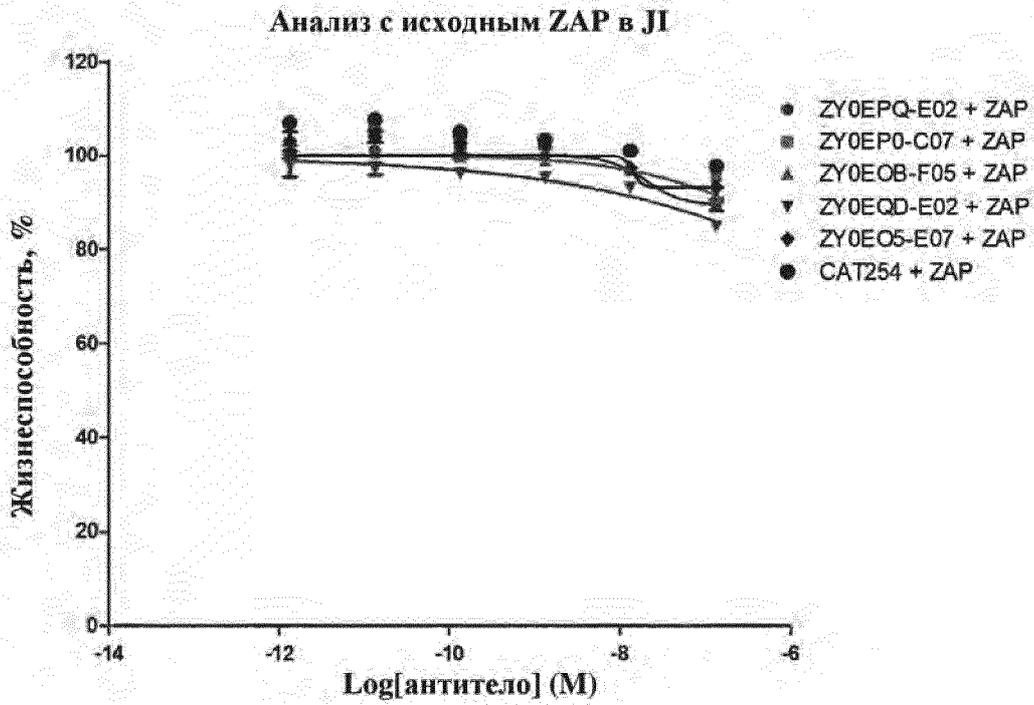
## ZAP-анализ в FI-B7H4 JI CHO



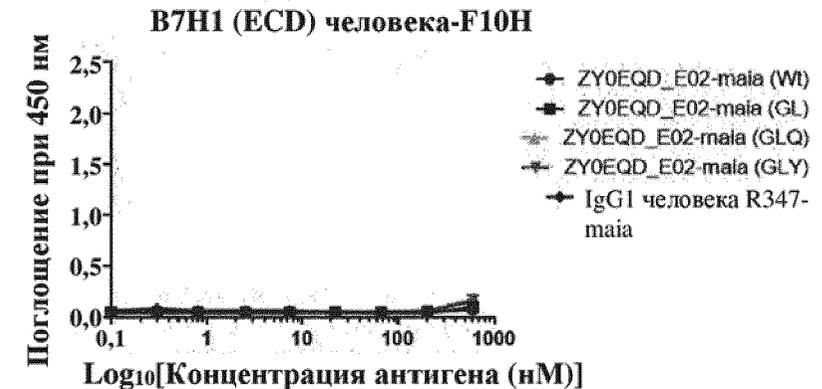
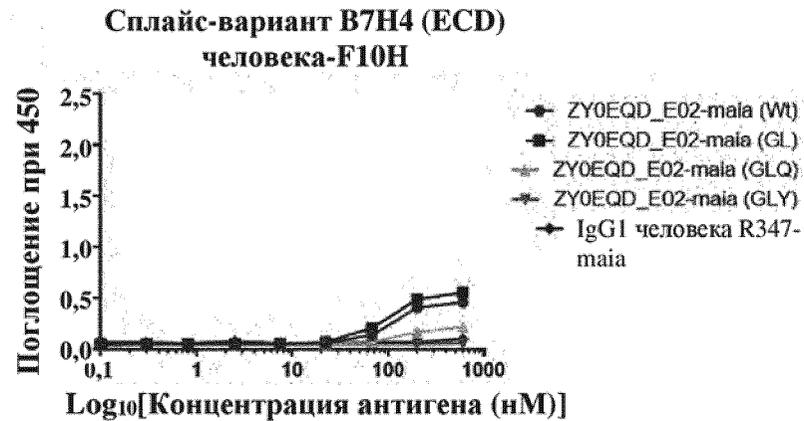
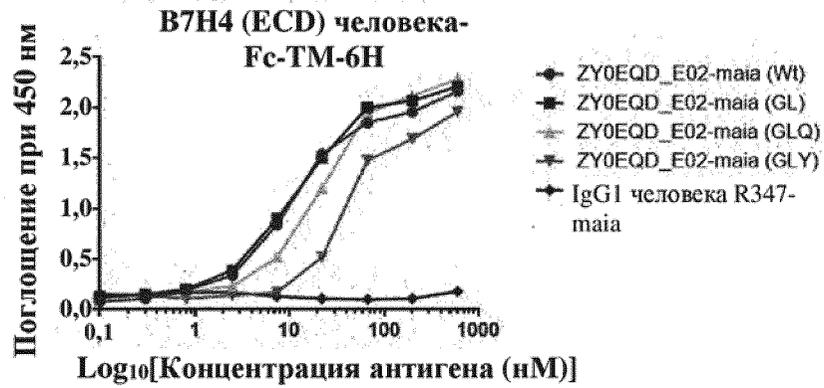
ФИГ. 5D

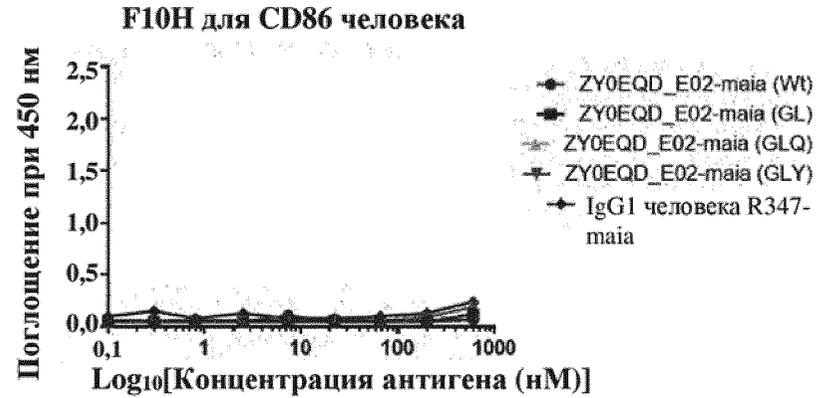
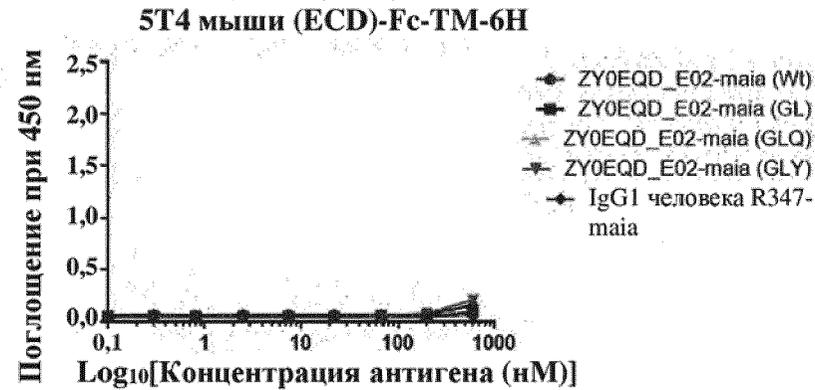
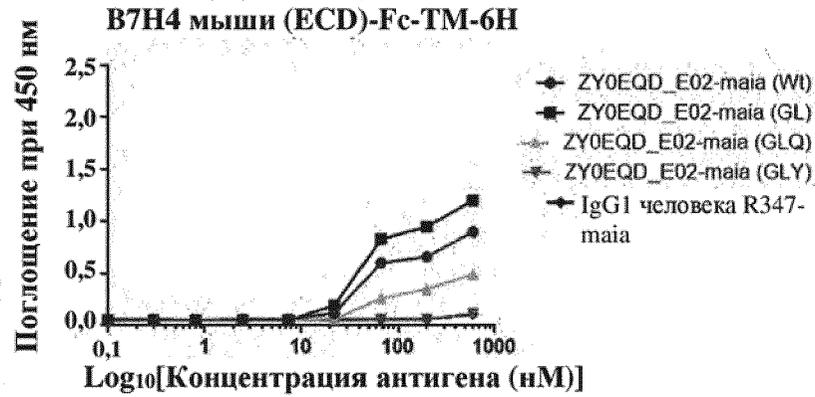


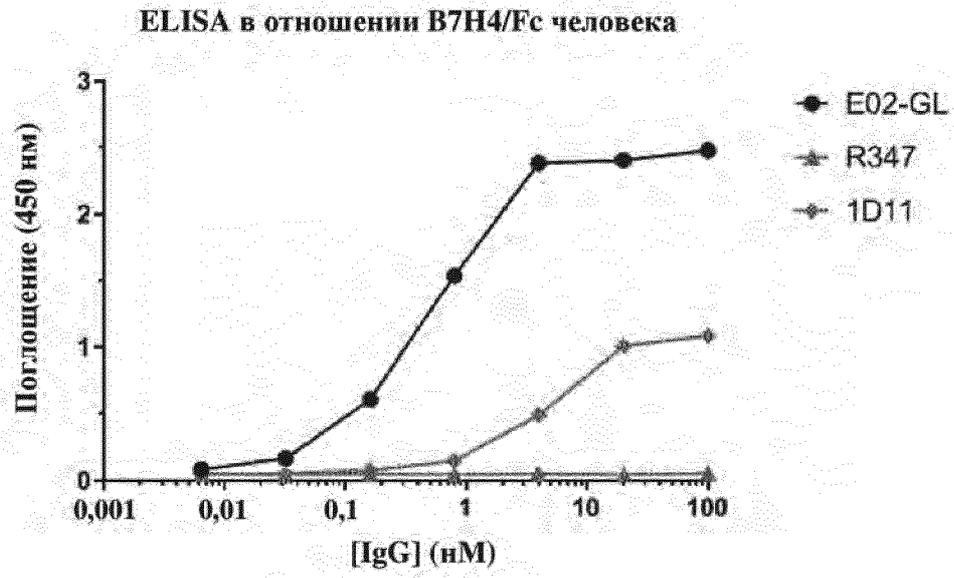
ФИГ. 5E



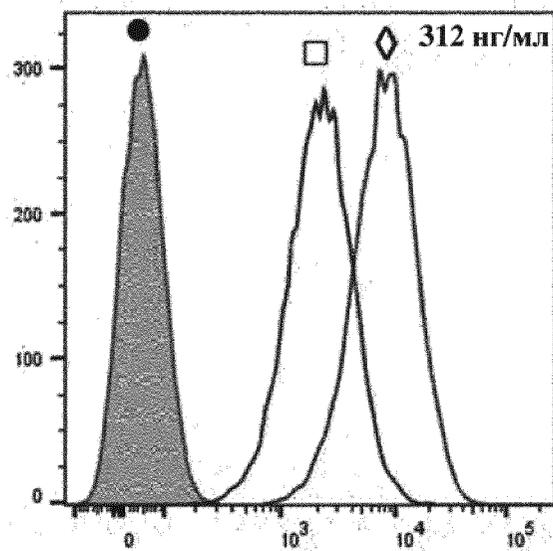
ФИГ. 5F





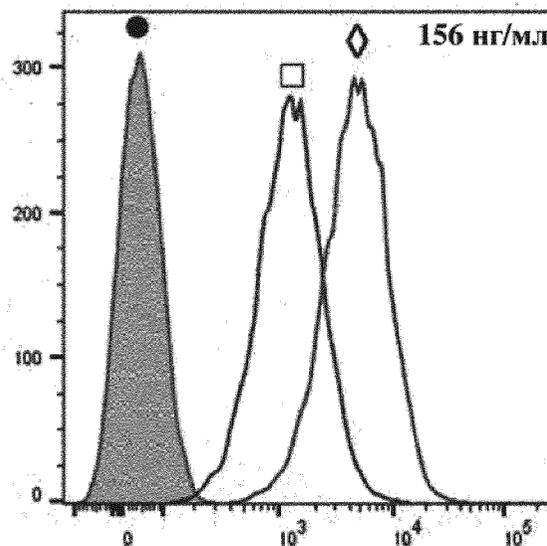


ФИГ. 7



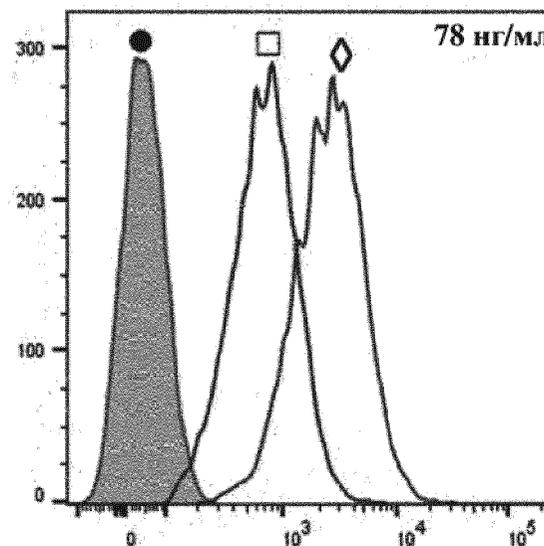
Comp-APC-A

Название подгруппы	Среднее геометрическое: Comp-APC-A
● ID11_312ng-ml	2076
□ E02-GL_312ng-ml	7655
◇ R347_312ng-ml	50,2



Comp-APC-A

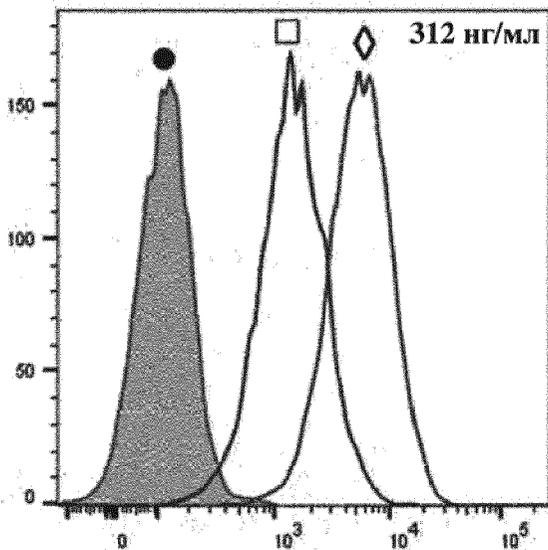
Название подгруппы	Среднее геометрическое: Comp-APC-A
● ID11_156ng-ml	1203
□ E02-GL_156ng-ml	4477
◇ R347_156ng-ml	47,8



Comp-APC-A

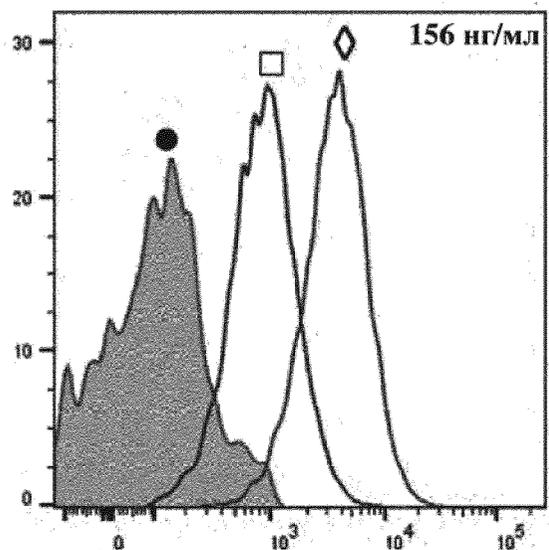
Название подгруппы	Среднее геометрическое: Comp-APC-A
● ID11_78ng-ml	884
□ E02-GL_78ng-ml	2400
◇ R347_78ng-ml	48,9

ФИГ. 8А



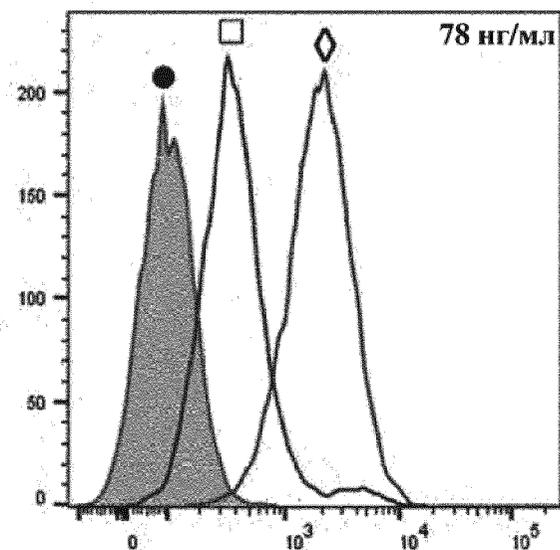
Comp-APC-A

Название подгруппы	Среднее геометрическое: Comp-APC-A
I011_312 ng-ml	1381
E02-G1_312 ng-ml	5238
R347_312 ng-ml	121



Comp-APC-A

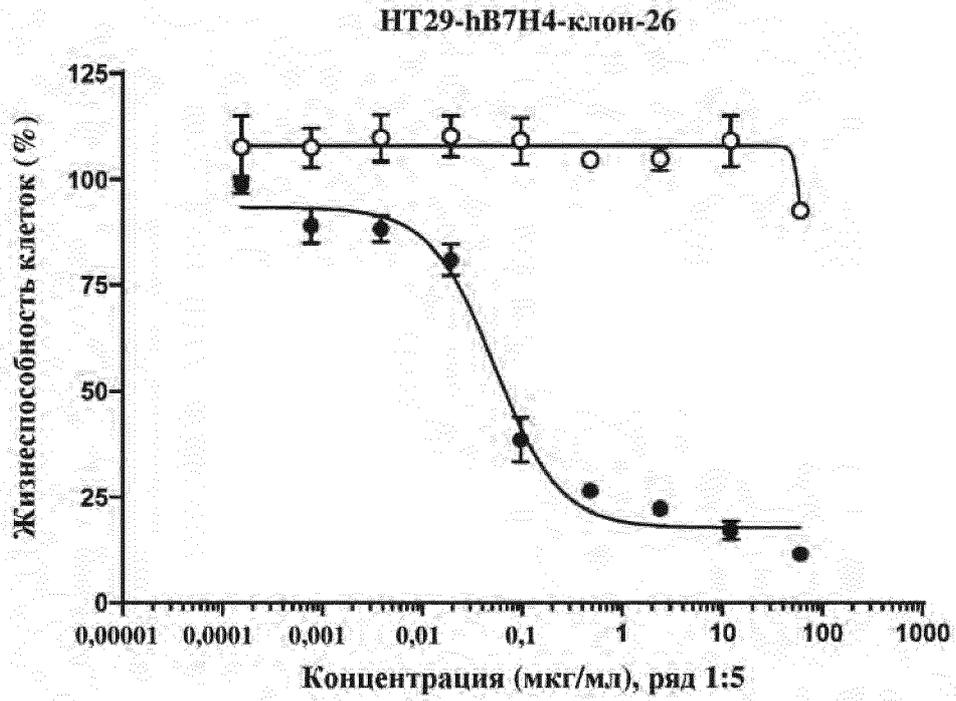
Название подгруппы	Среднее геометрическое: Comp-APC-A
I011_156 ng-ml	846
E02-G1_156ng-ml	3473
R347_156 ng-ml	105



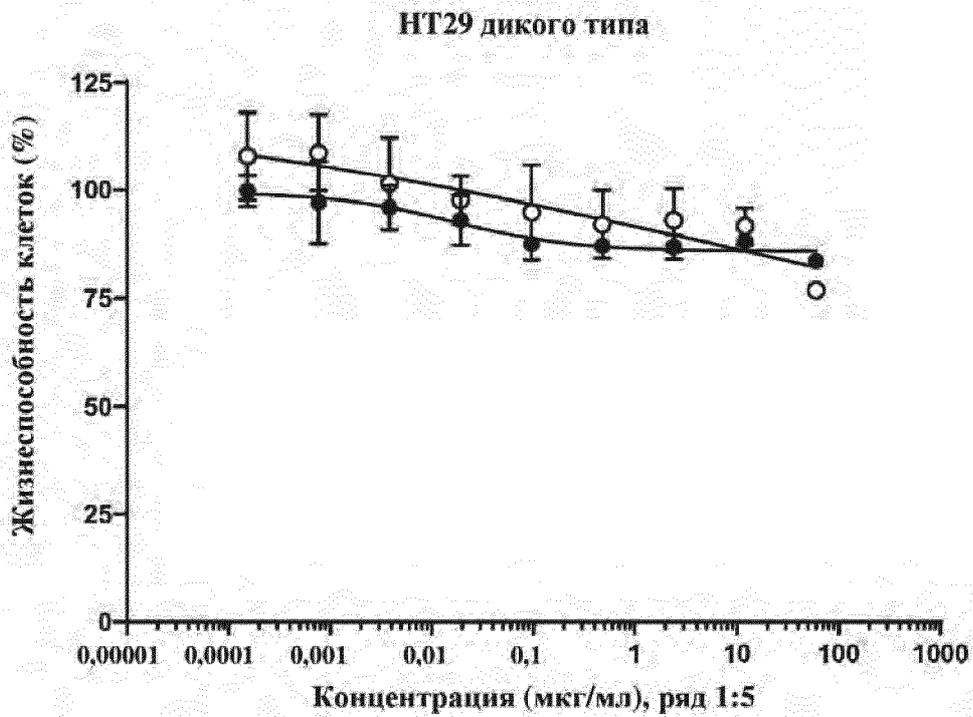
Comp-APC-A

Название подгруппы	Среднее геометрическое: Comp-APC-A
I011_78 ng-ml	399
E02-G1_78 ng-ml	1889
R347_78 ng-ml	101

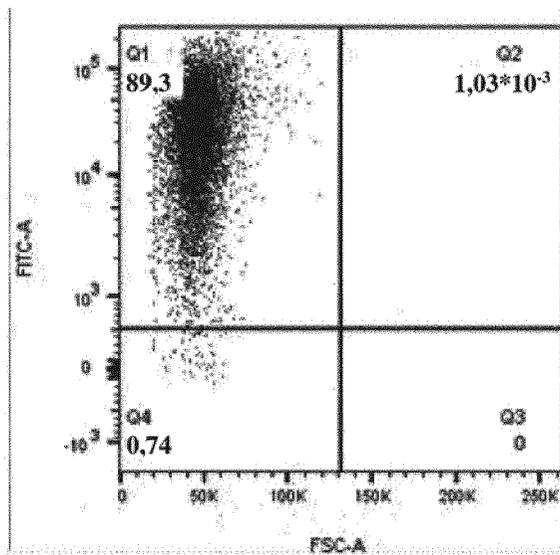
ФИГ. 8В



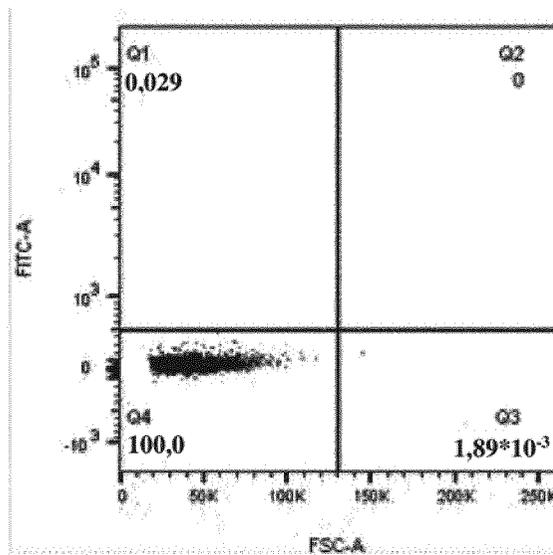
ФИГ. 9А



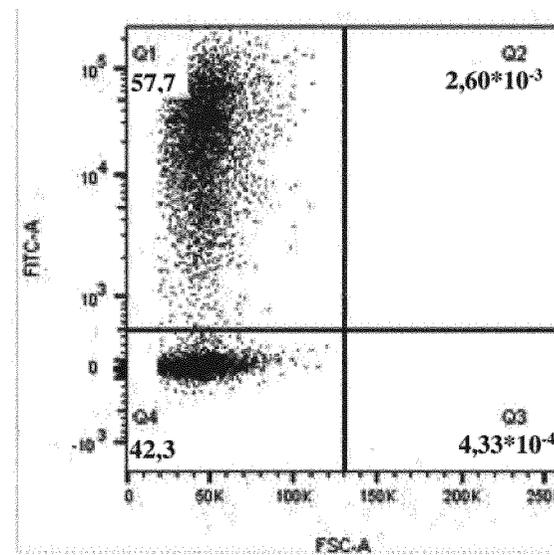
ФИГ. 9В



Отрицательные по В7-Н4  
HT29-GFP

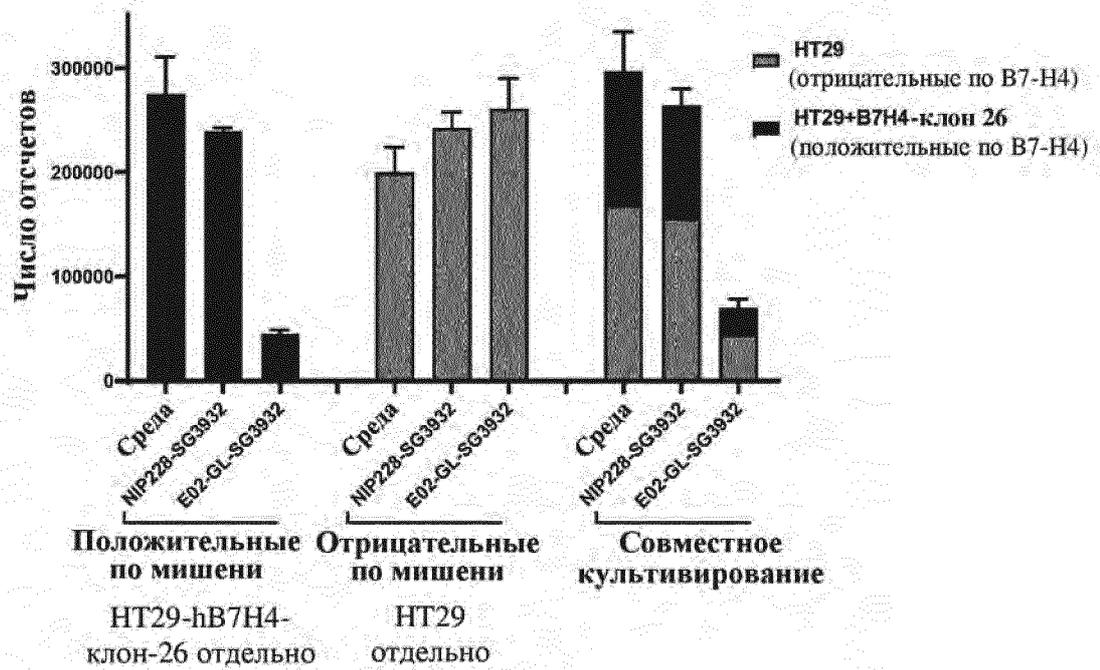


Положительные по В7-Н4  
HT29+B7-H4 CI26



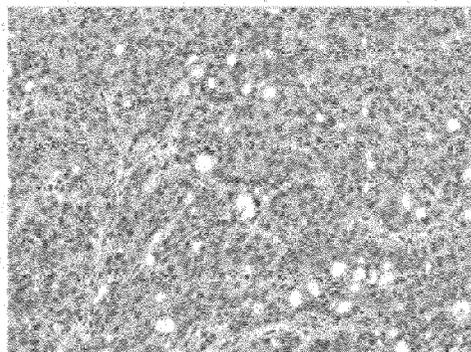
Совместное культивирование

ФИГ. 10А



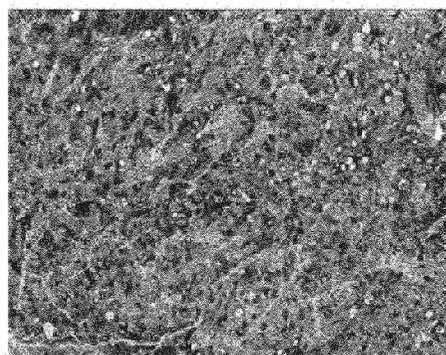
ФИГ. 10В

## B7-H4 IHC:



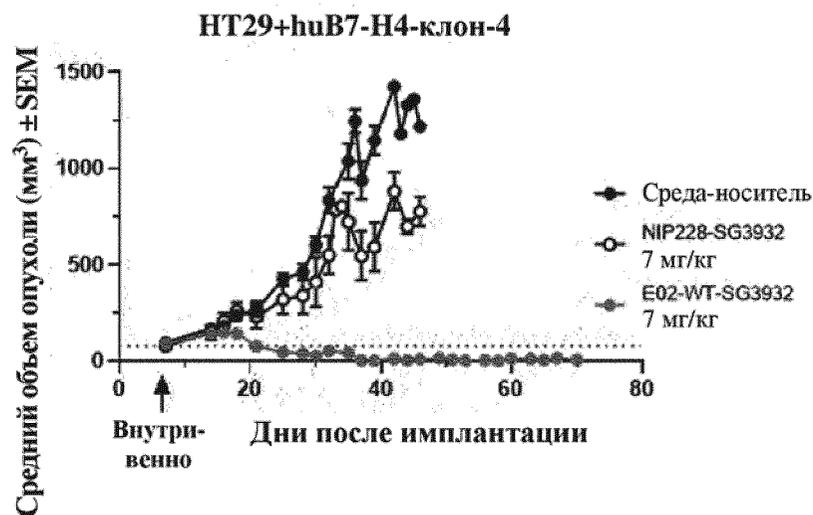
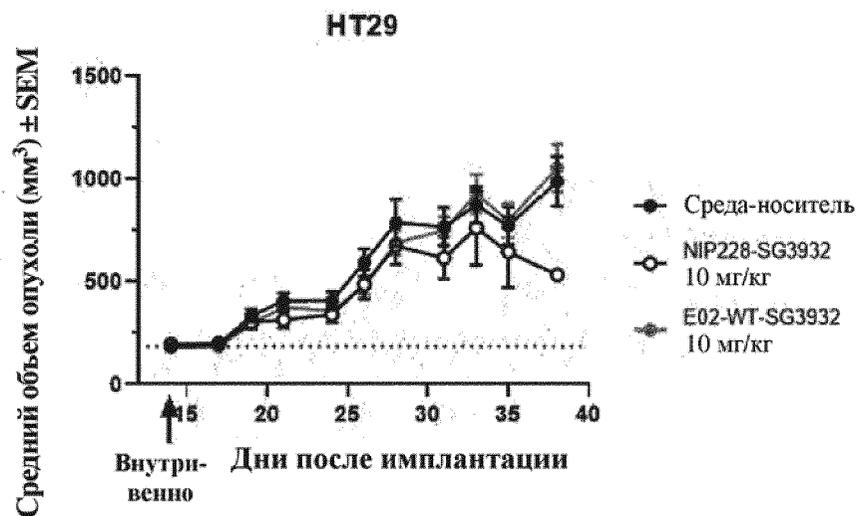
### HT29:

Модель, отрицательная по B7-H4



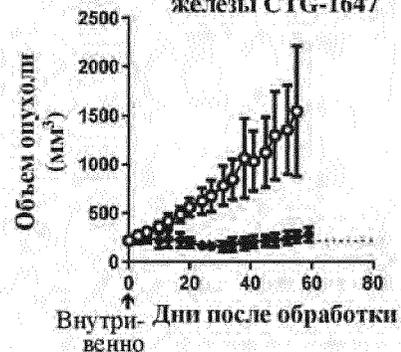
### HT29+huB7H4-клон-4:

Модель с неоднородной экспрессией  
40% 3+ B7-H4,  
60% отрицательных по B7-H4

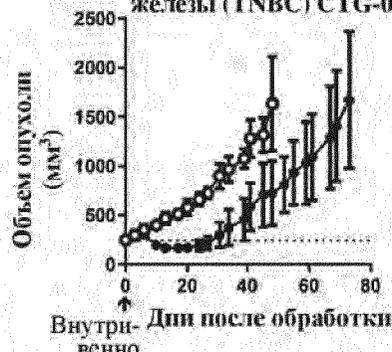


ФИГ. 11

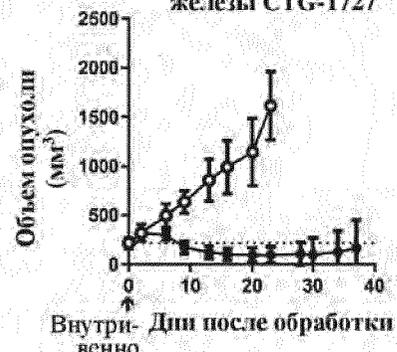
PDX-модель из клеток  
молочной  
железы CTG-1647



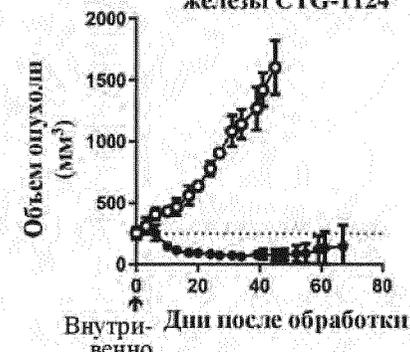
PDX-модель из клеток  
молочной  
железы (TNBC) CTG-0052



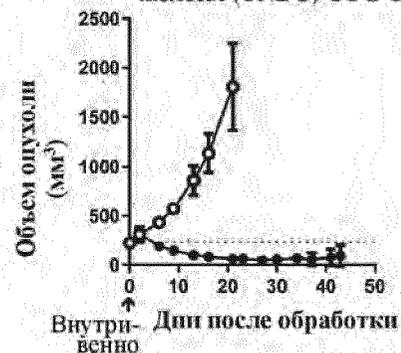
PDX-модель из клеток  
молочной  
железы CTG-1727



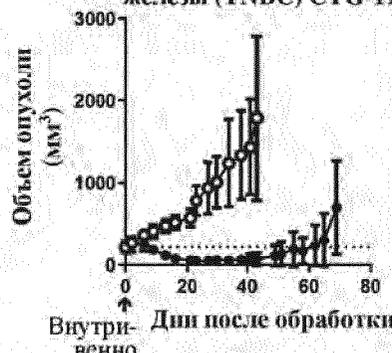
PDX-модель из клеток  
молочной  
железы CTG-1124



PDX-модель из клеток  
молочной  
железы (TNBC) CTG-1242



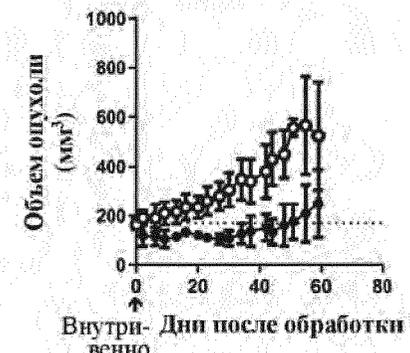
PDX-модель из клеток  
молочной  
железы (TNBC) CTG-1153



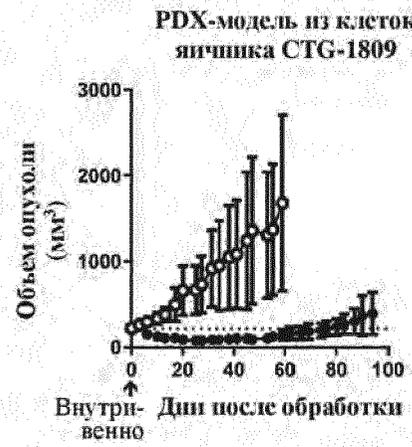
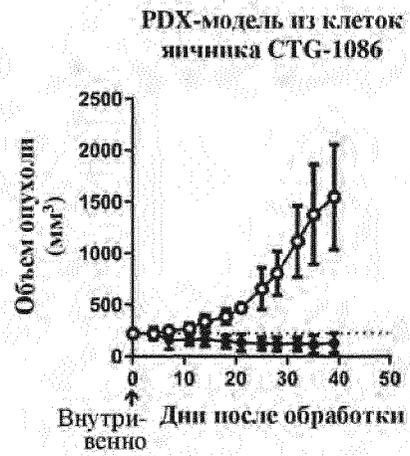
PDX-модель из клеток  
молочной  
железы (TNBC) CTG-0012



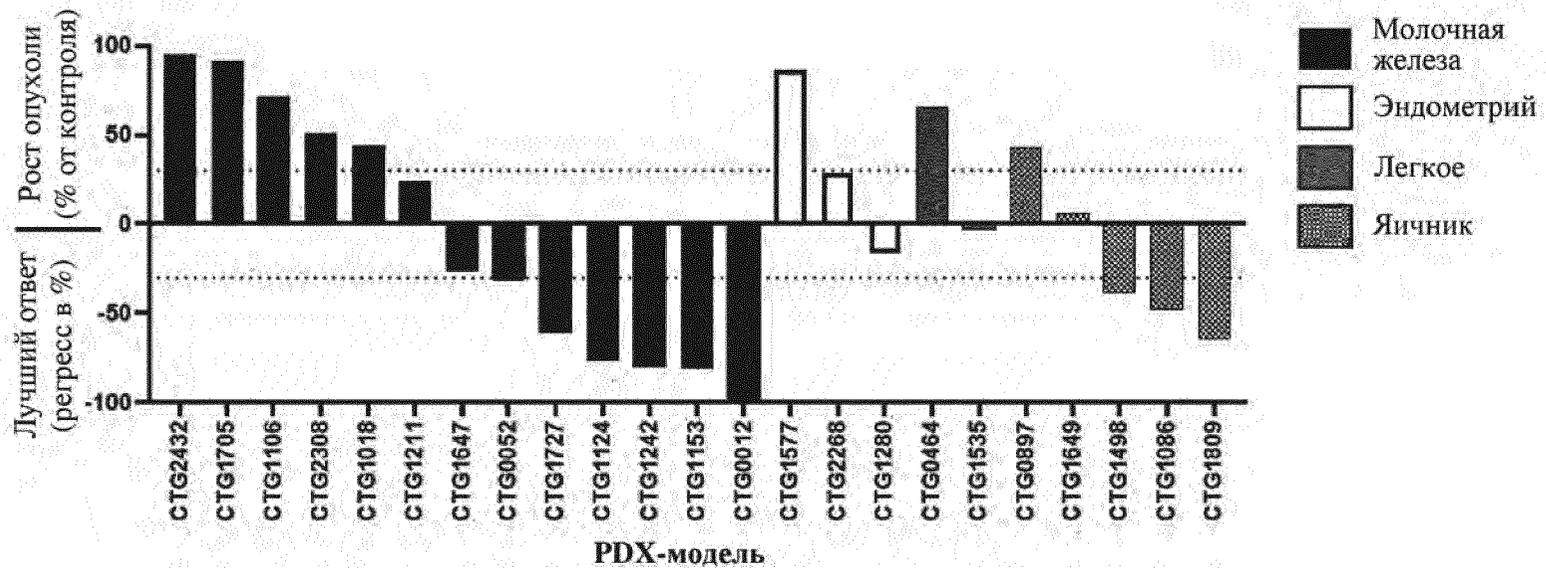
PDX-модель из клеток  
яичника CTG-1498



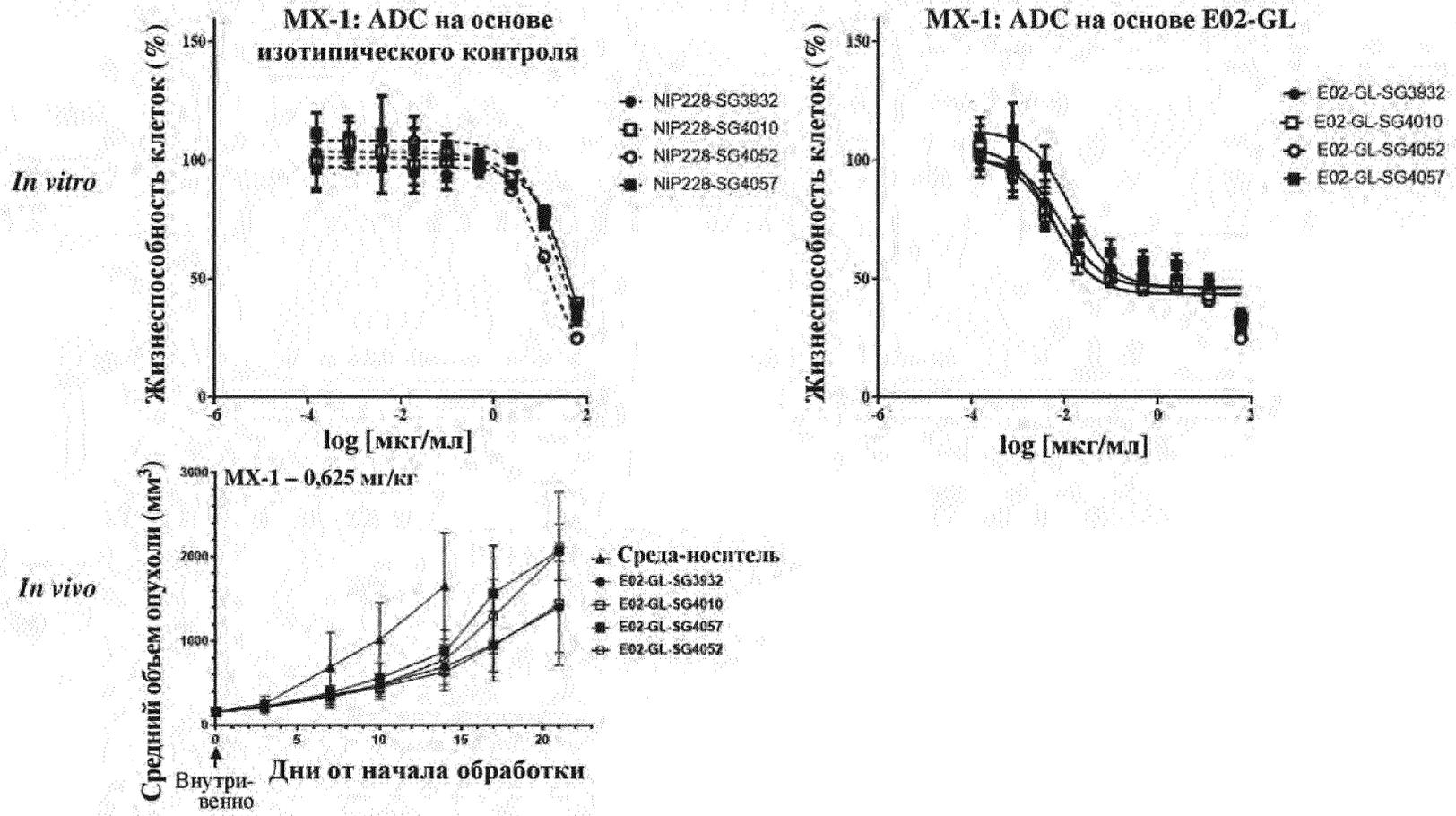
ФИГ. 12



**ФИГ. 12 (продолжение)**

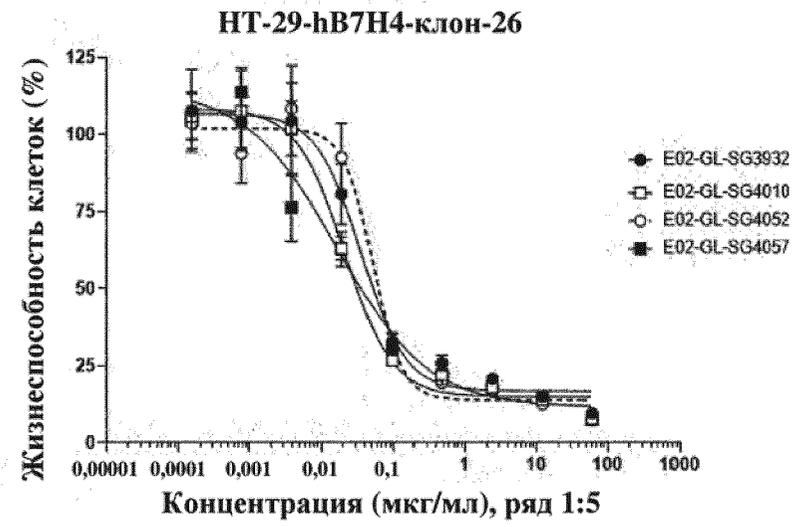
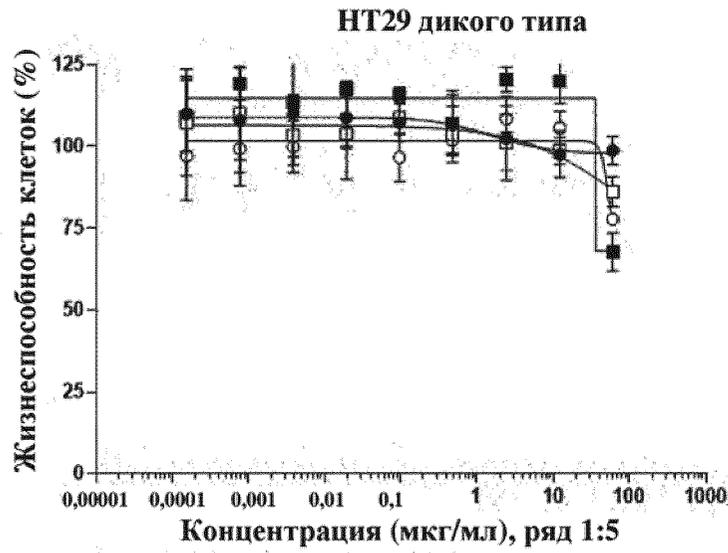


ФИГ. 13

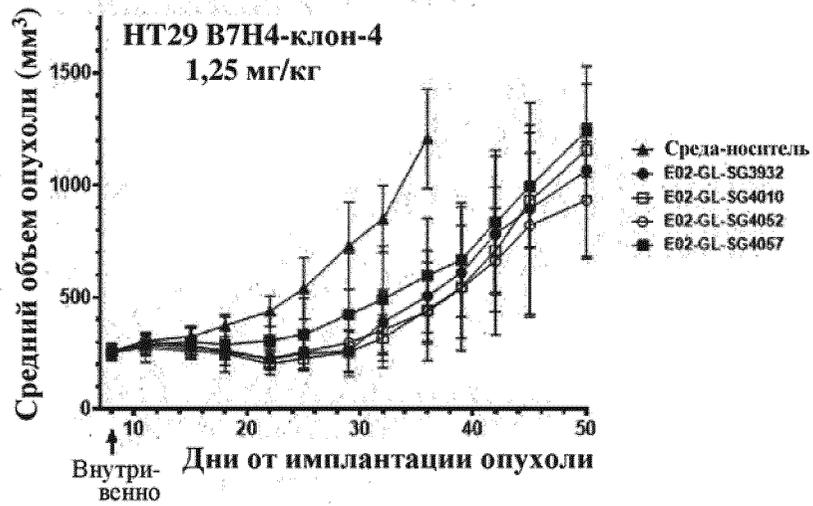


ФИГ. 14А

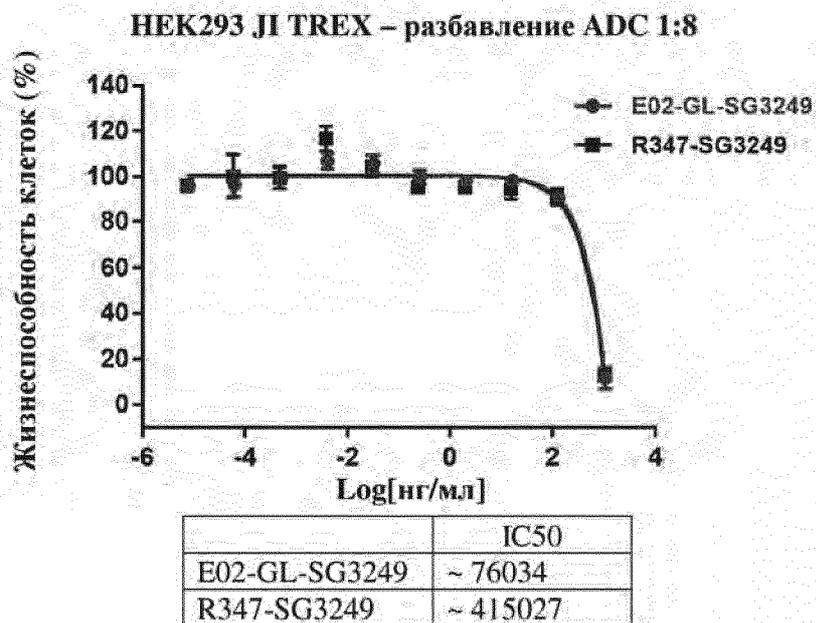
*In vitro*



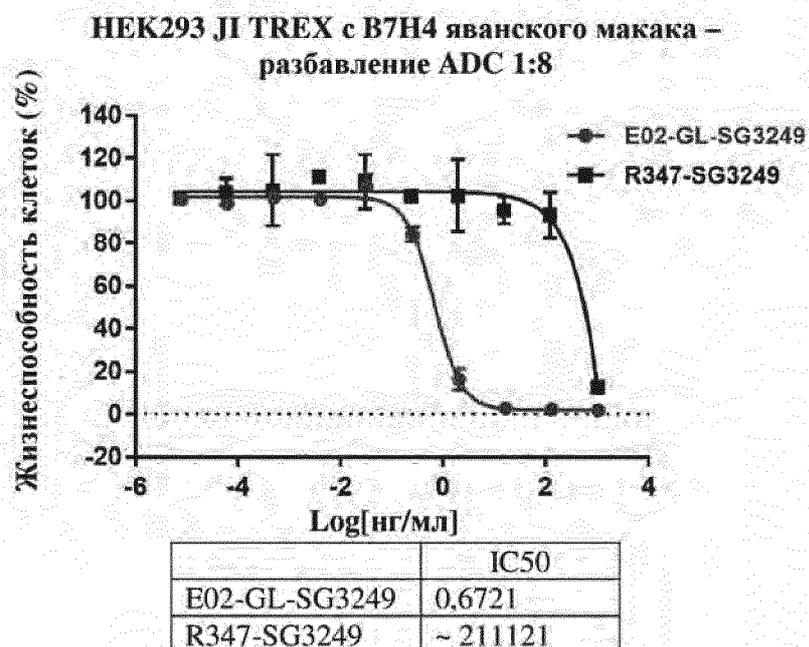
*In vivo*



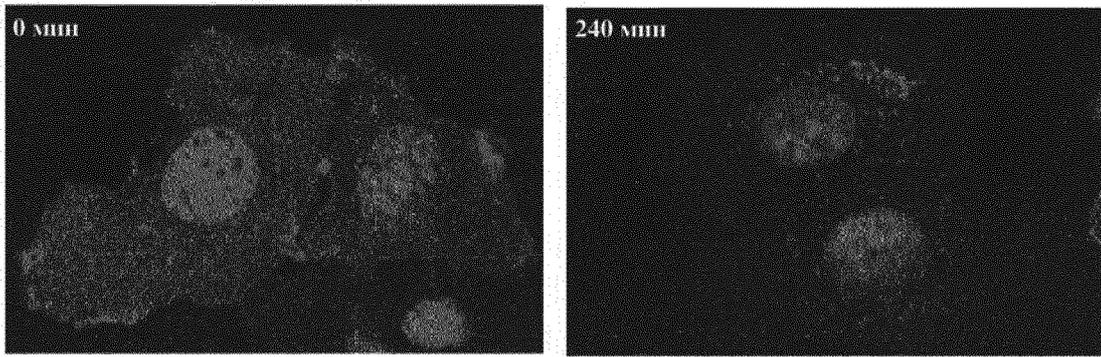
ФИГ. 14В



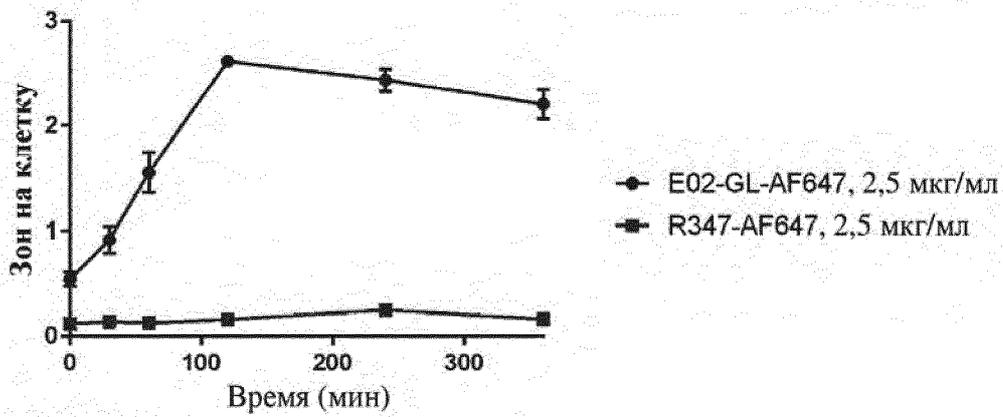
ФИГ. 15А



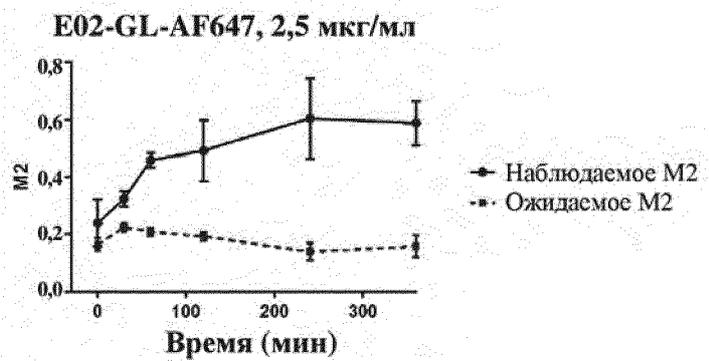
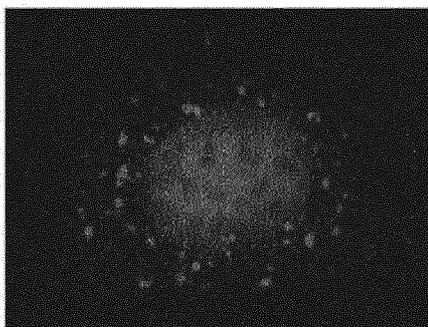
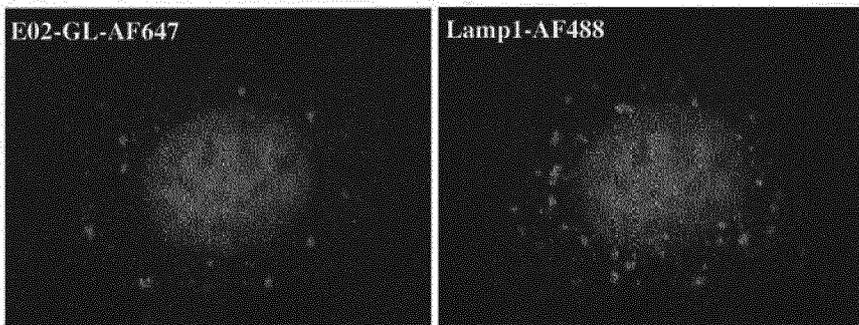
ФИГ. 15В



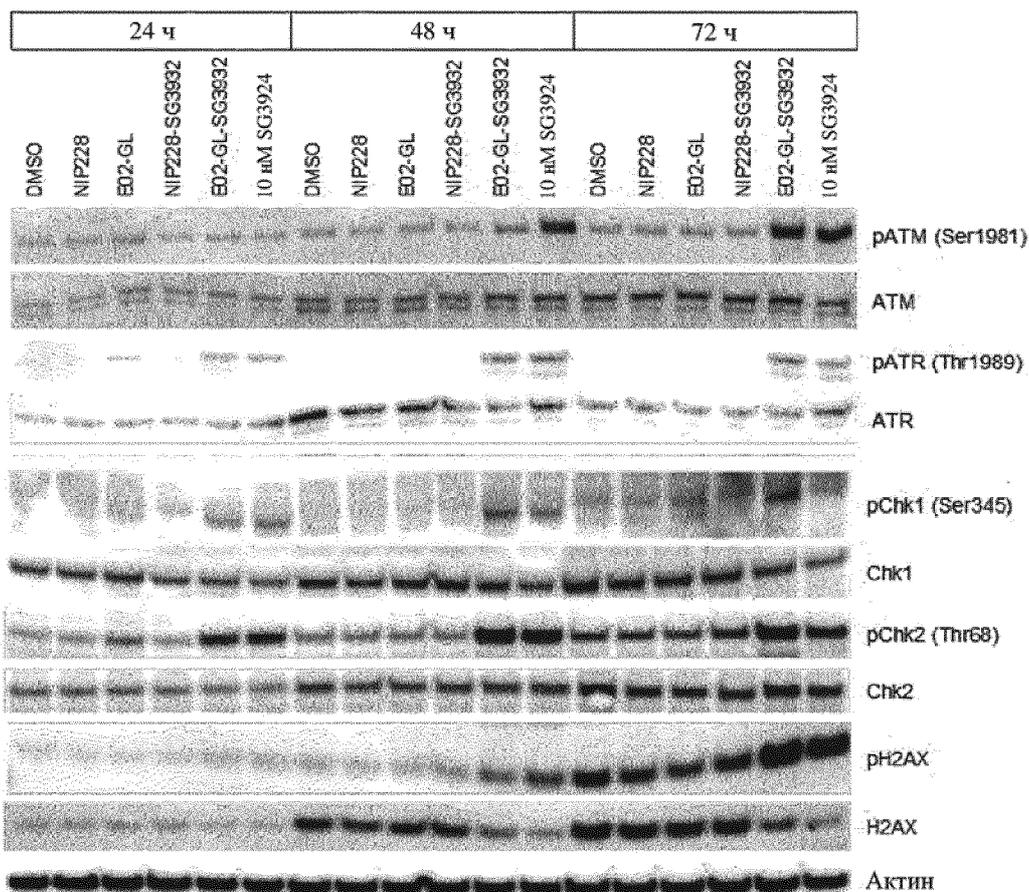
ФИГ. 16А



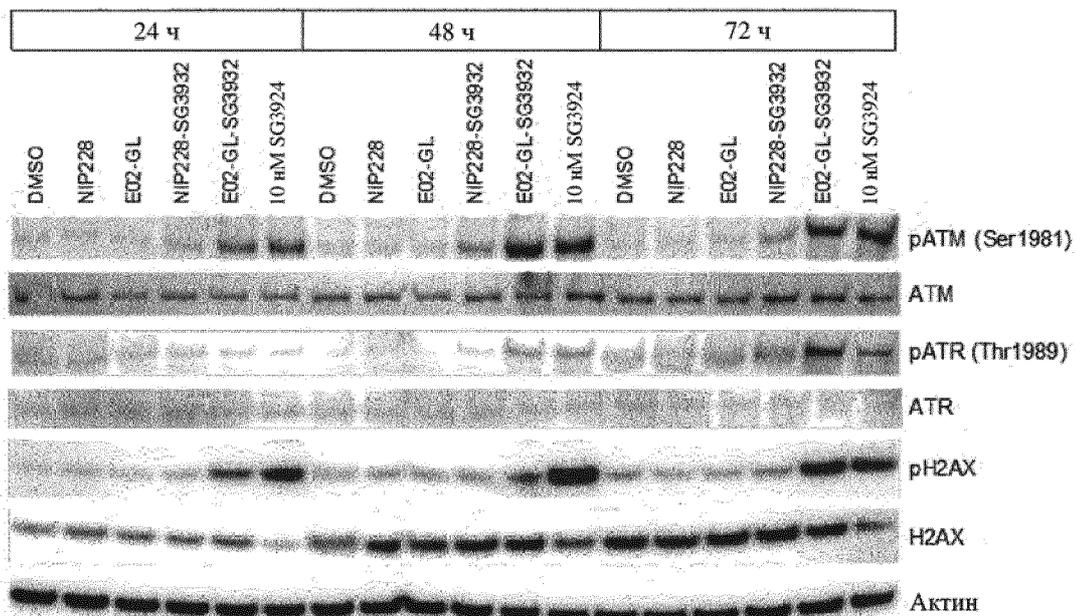
ФИГ. 16В



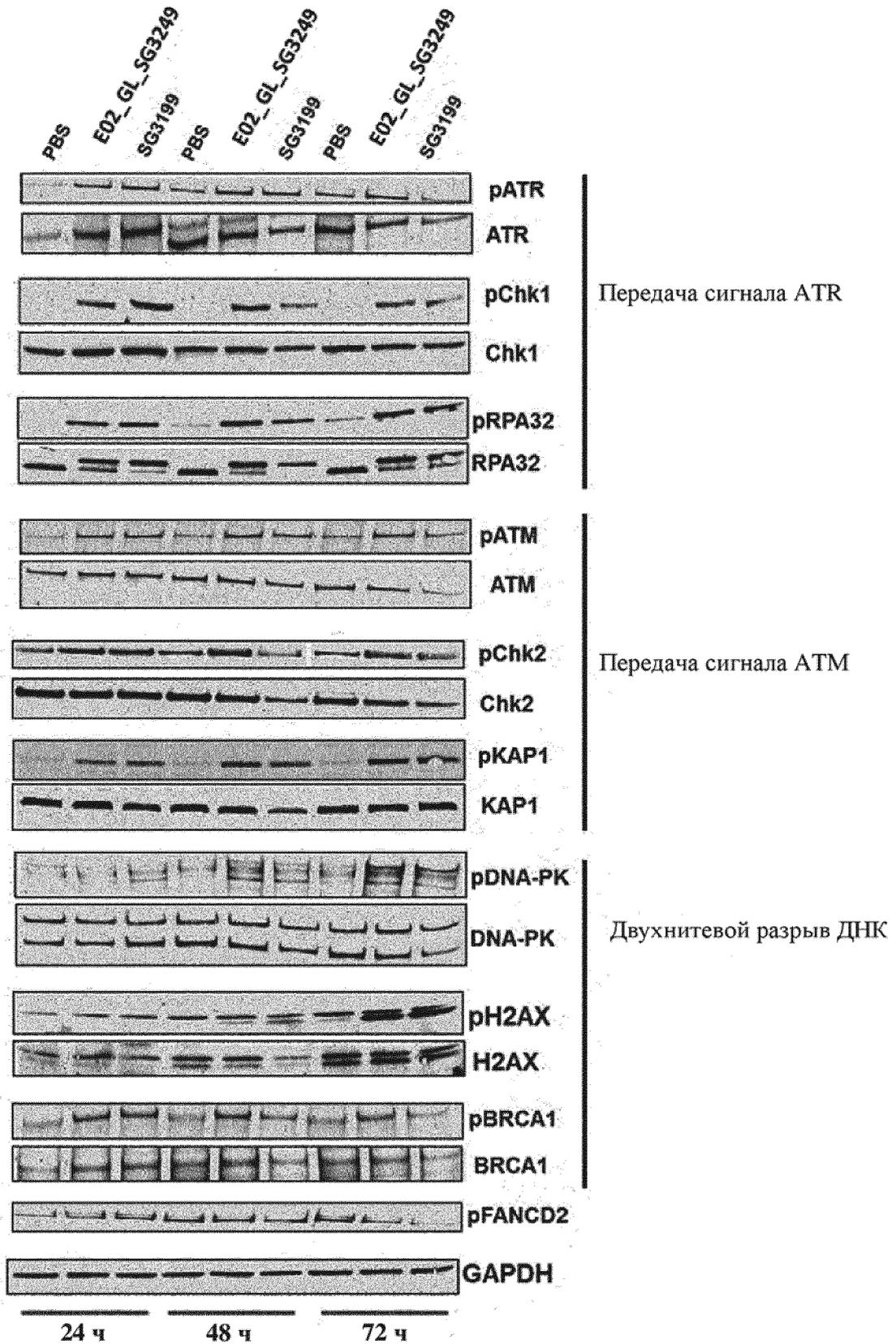
ФИГ. 16С



ФИГ. 17А

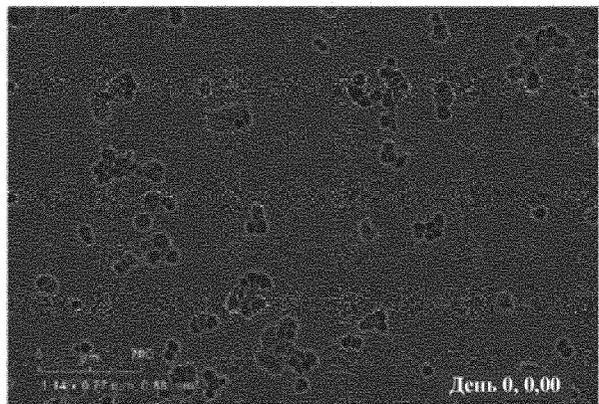


ФИГ. 17В

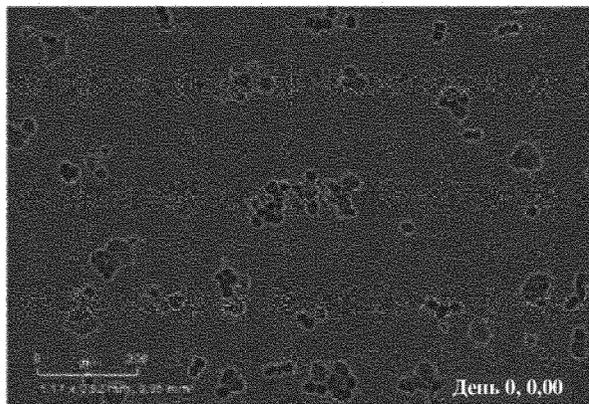


ФИГ. 17С

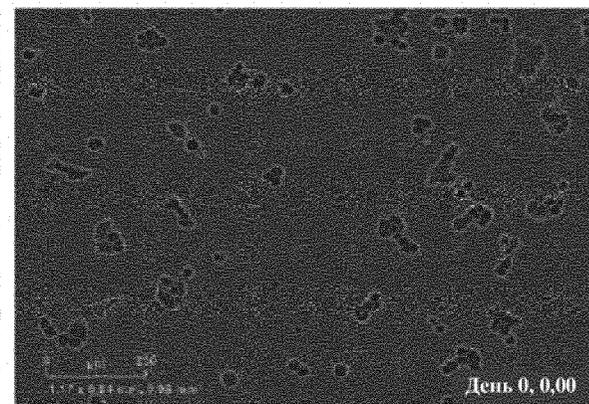
E02\_GL\_SG3249



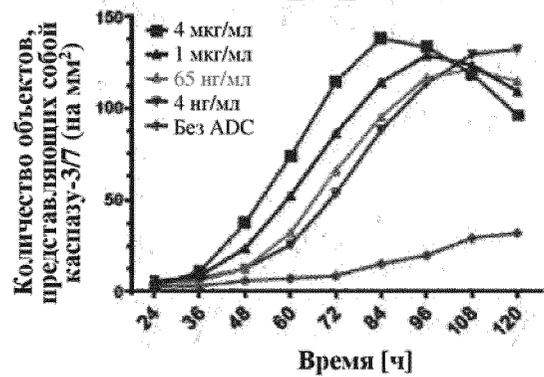
Поражающий элемент SG3199 (10 нМ)



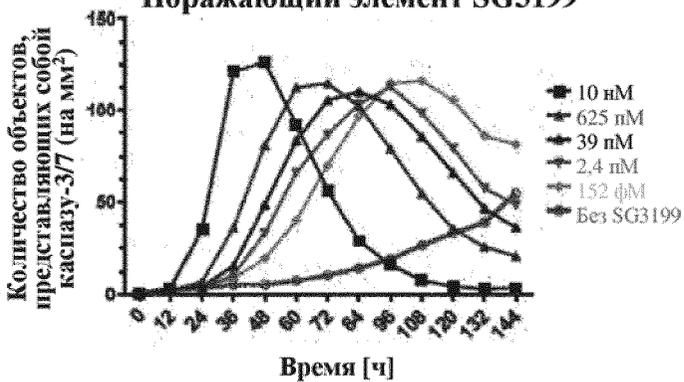
Олапариб (40 нМ)



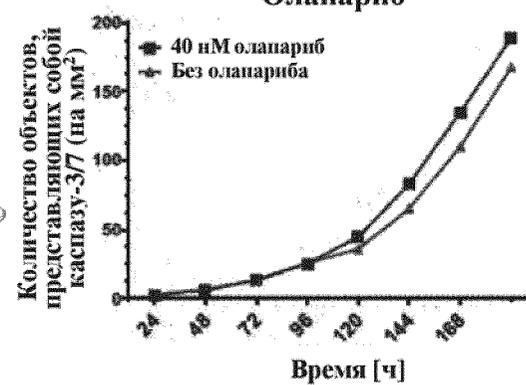
E02\_GL\_SG3249



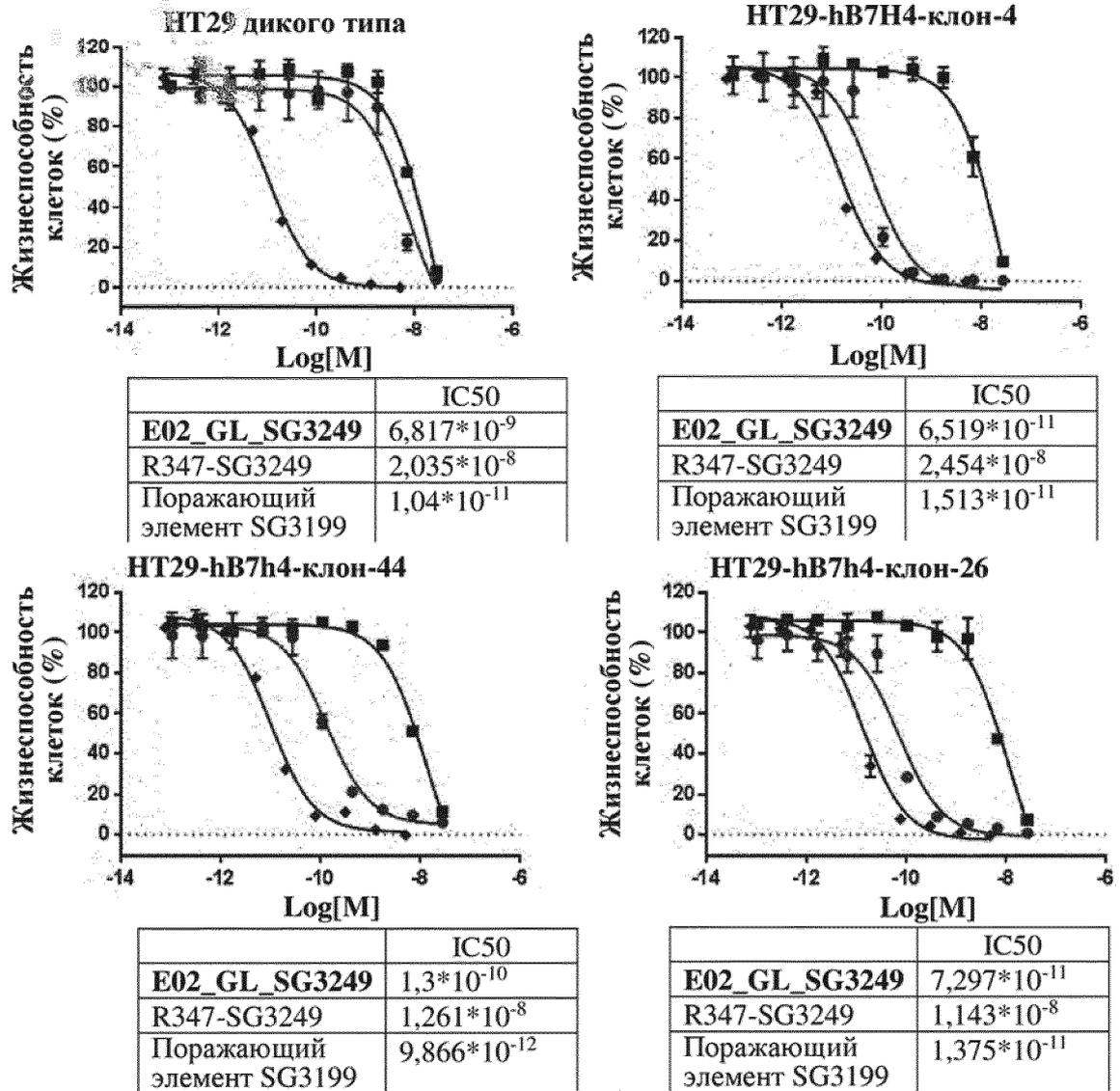
Поражающий элемент SG3199



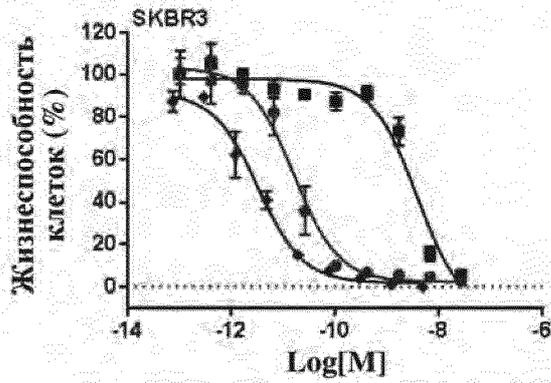
Олапариб



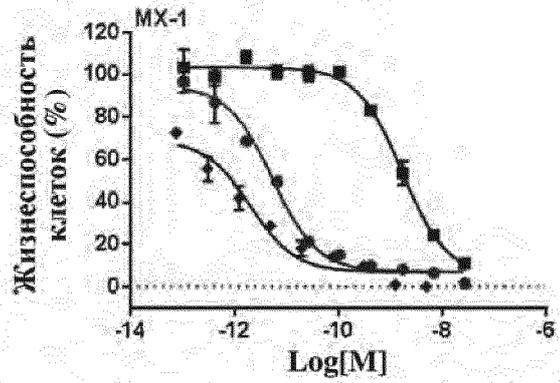
ФИГ. 18



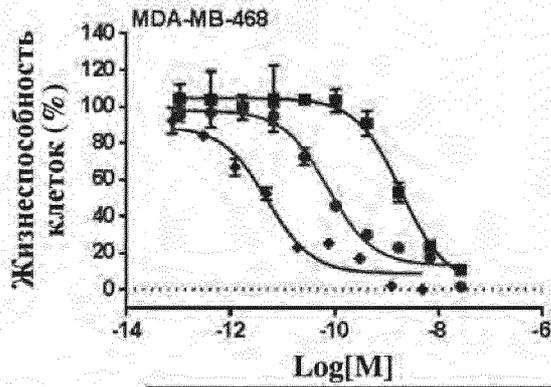
ФИГ. 19



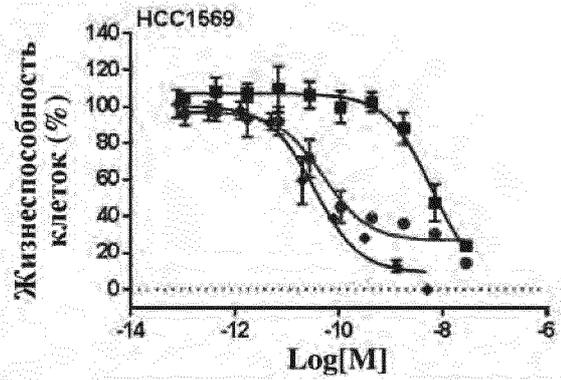
	IC50
E02_GL_SG3249	$1,647 \cdot 10^{-11}$
R347-SG3249	$3,396 \cdot 10^{-9}$
Поражающий элемент SG3199	$9,38 \cdot 10^{-12}$



	IC50
E02_GL_SG3249	$5,414 \cdot 10^{-12}$
R347-SG3249	$1,7 \cdot 10^{-9}$
Поражающий элемент SG3199	$2,055 \cdot 10^{-12}$

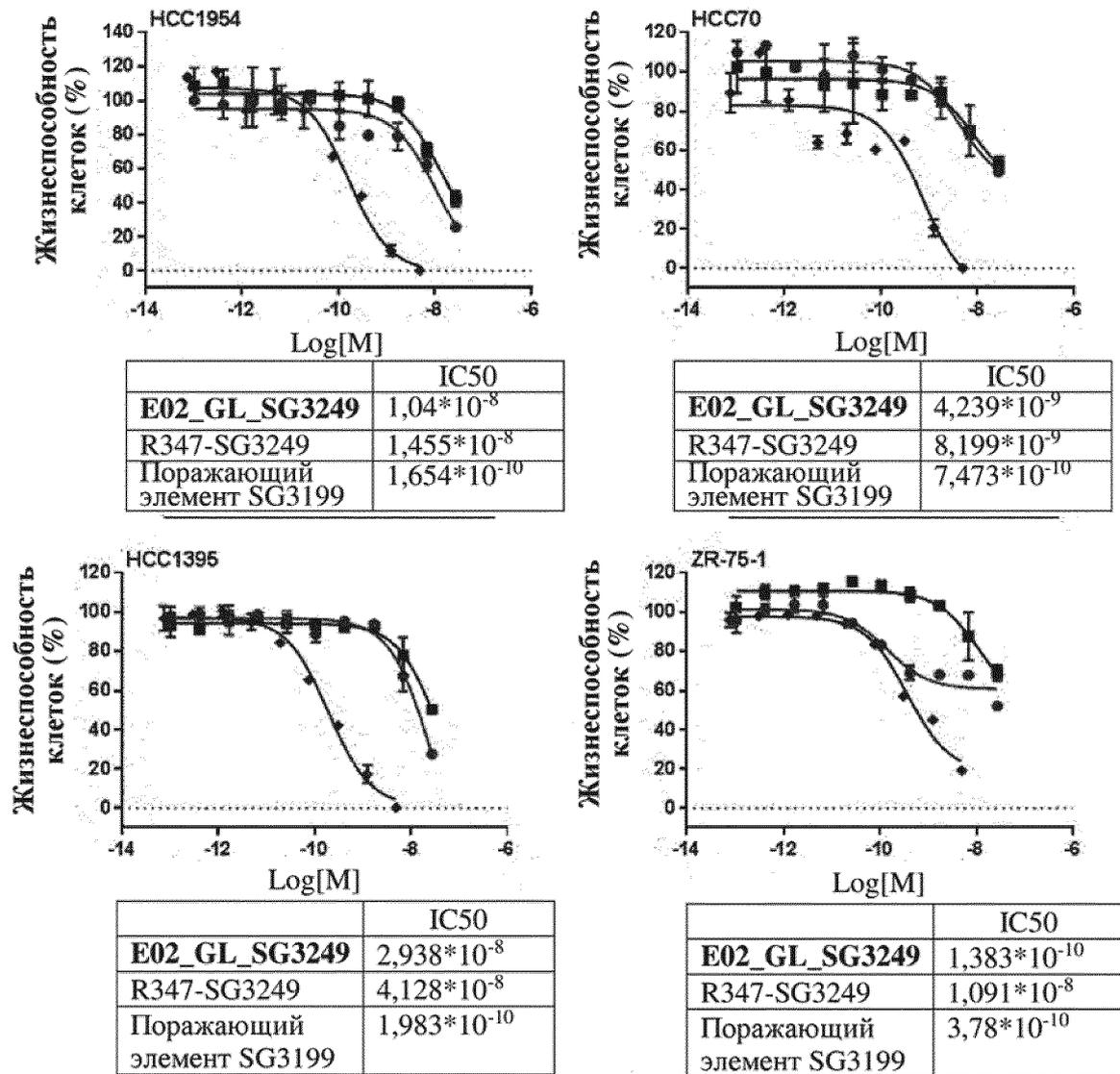


	IC50
E02_GL_SG3249	$7,422 \cdot 10^{-11}$
R347-SG3249	$1,916 \cdot 10^{-9}$
Поражающий элемент SG3199	$5,054 \cdot 10^{-12}$

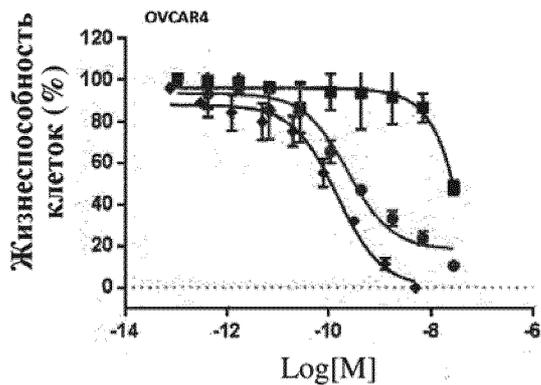


	IC50
E02_GL_SG3249	$4,859 \cdot 10^{-11}$
R347-SG3249	$5,819 \cdot 10^{-9}$
Поражающий элемент SG3199	$3,328 \cdot 10^{-11}$

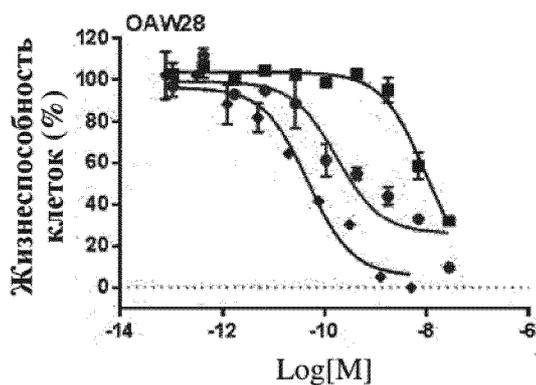
ФИГ. 19 (продолжение)



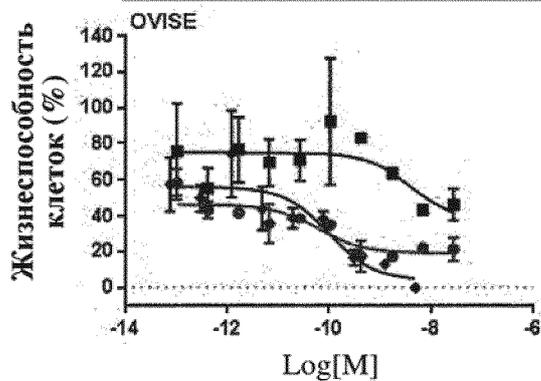
ФИГ. 19 (продолжение)



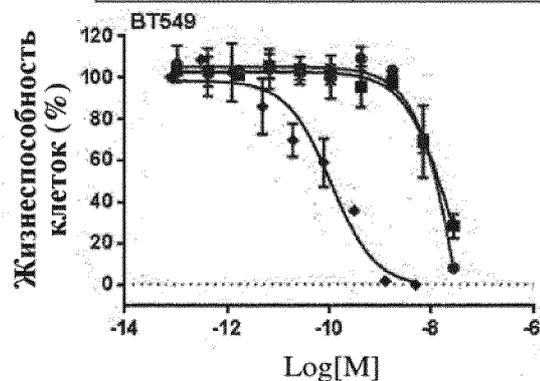
	IC50
E02_GL_SG3249	$2,356 \cdot 10^{-10}$
R347-SG3249	$\sim 1,099 \cdot 10^{-5}$
Поражающий элемент SG3199	$1,467 \cdot 10^{-10}$



	IC50
E02_GL_SG3249	$1,746 \cdot 10^{-10}$
R347-SG3249	$9,912 \cdot 10^{-9}$
Поражающий элемент SG3199	$4,762 \cdot 10^{-11}$

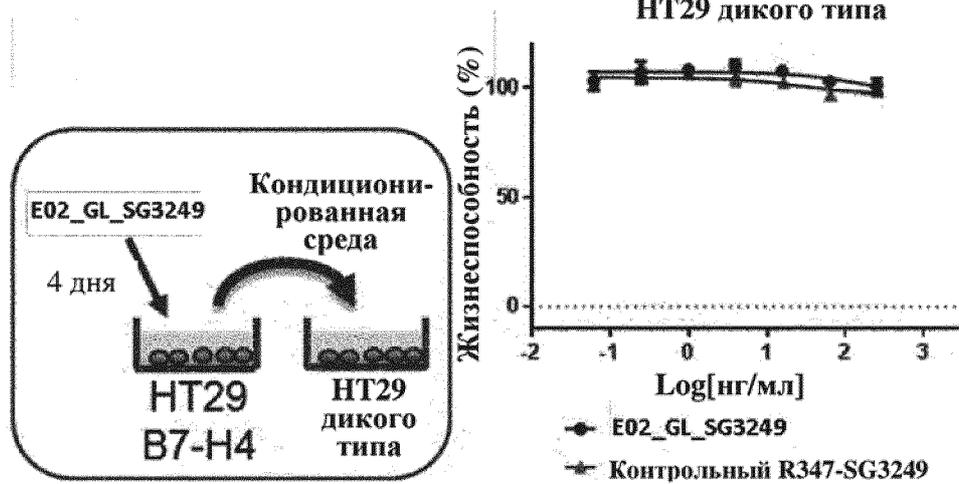


	IC50
E02_GL_SG3249	$6,177 \cdot 10^{-11}$
R347-SG3249	$4,078 \cdot 10^{-9}$
Поражающий элемент SG3199	$1,001 \cdot 10^{-10}$

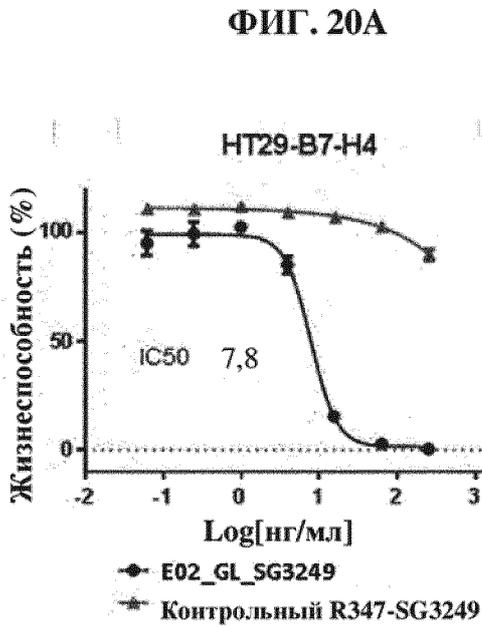


	IC50
E02_GL_SG3249	$4,757 \cdot 10^{-8}$
R347-SG3249	$2,18 \cdot 10^{-8}$
Поражающий элемент SG3199	$1,003 \cdot 10^{-10}$

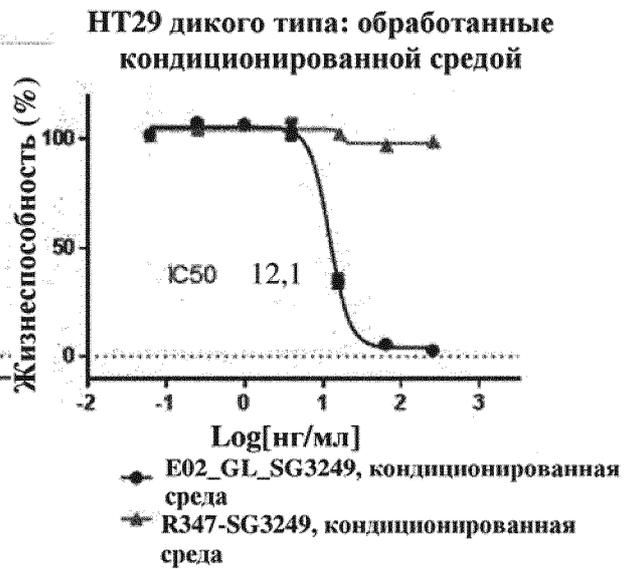
ФИГ. 19 (продолжение)



ФИГ. 20В

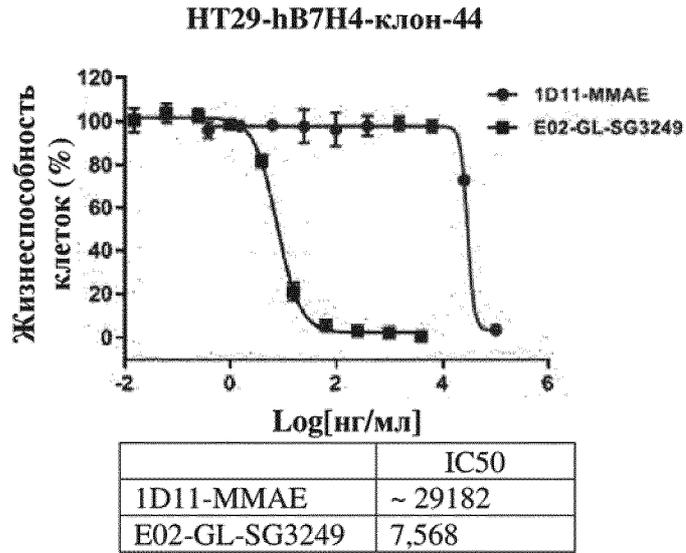


ФИГ. 20С

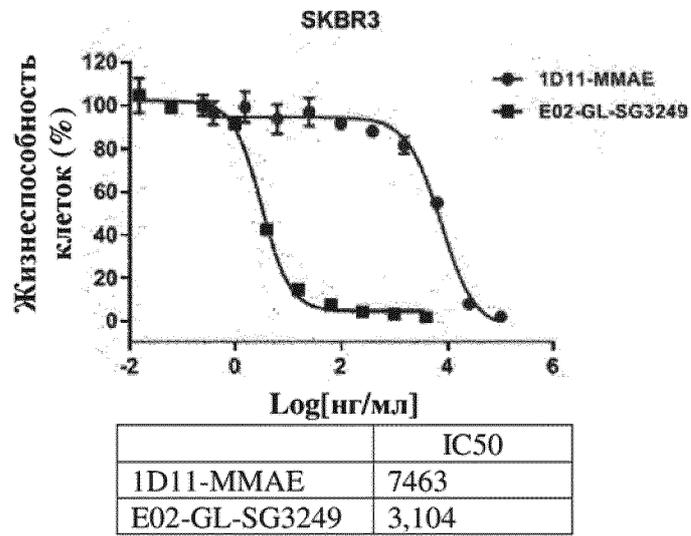


ФИГ. 20D

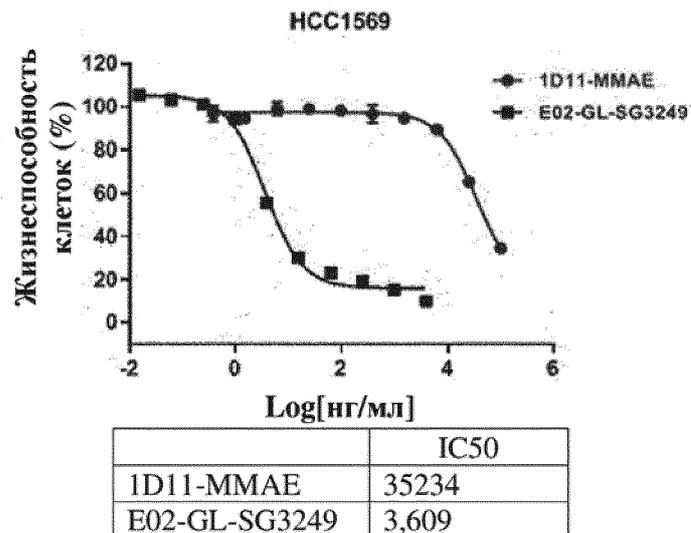
ФИГ. 21А



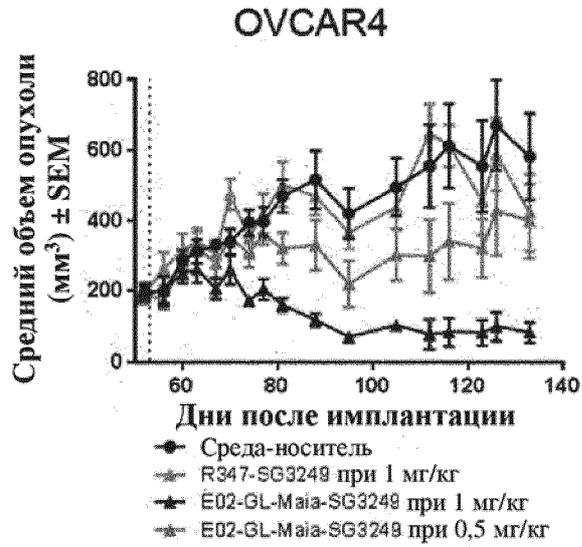
ФИГ. 21В



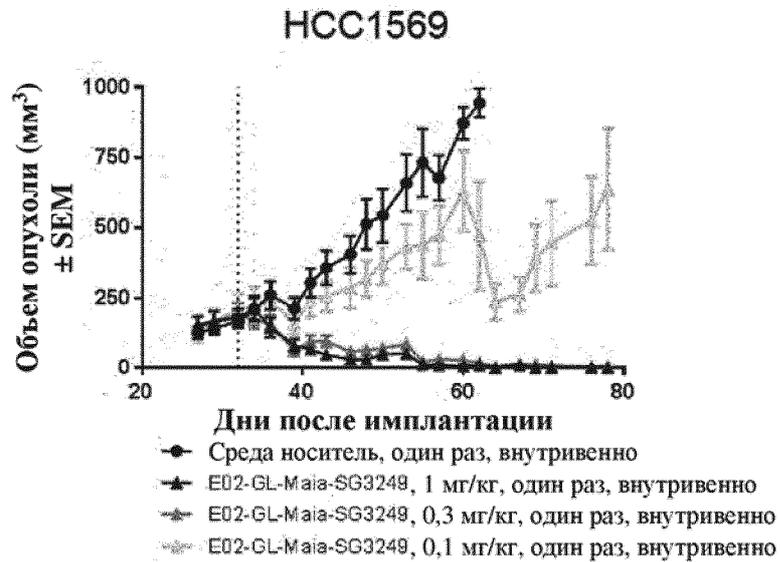
ФИГ. 21С



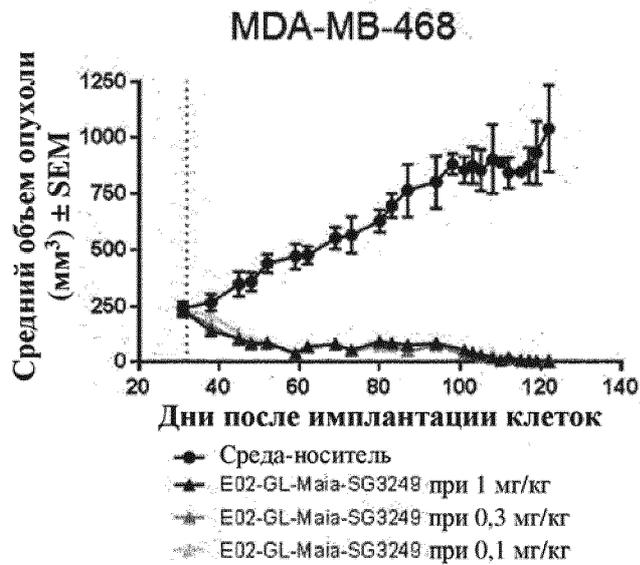
ФИГ. 22А

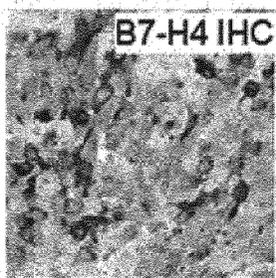


ФИГ. 22В

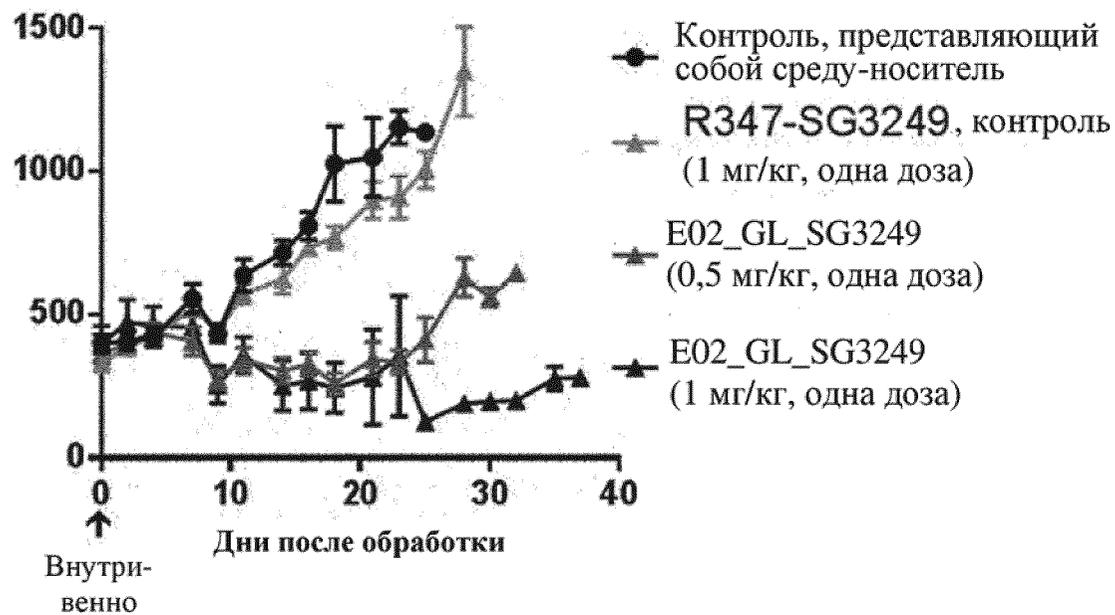


ФИГ. 22С



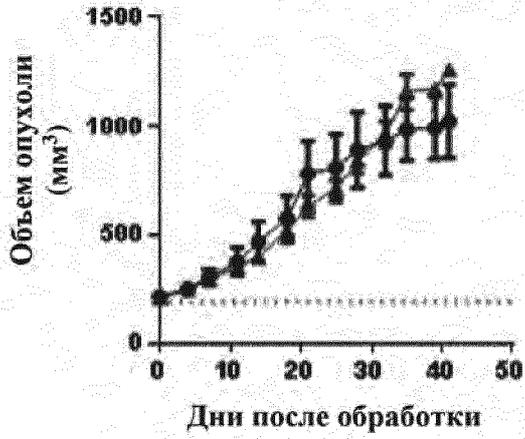


Средний объем опухоли (мм<sup>3</sup>)  
± SEM



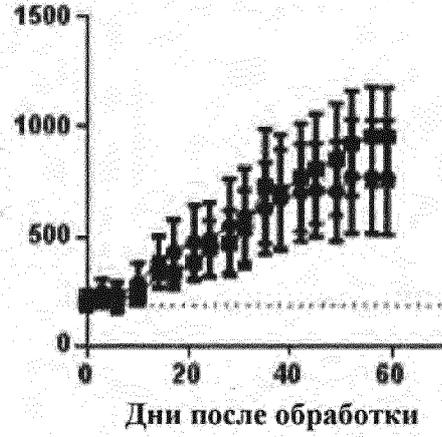
ФИГ. 23

**PDX-модель из клеток  
яичника CTG-0992**



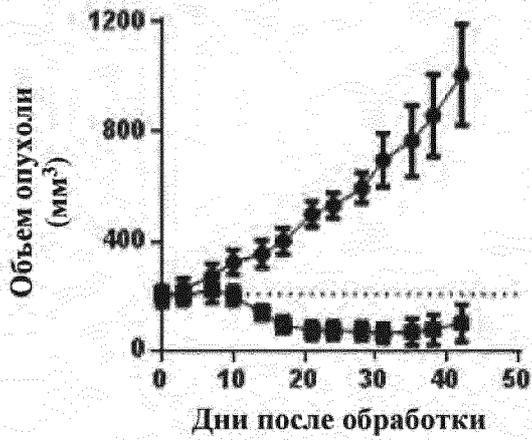
**ФИГ. 24А**

**PDX-модель из клеток  
яичника CTG-0897**



**ФИГ. 24В**

**PDX-модель из трижды  
отрицательных клеток  
молочной железы HBCx-11**

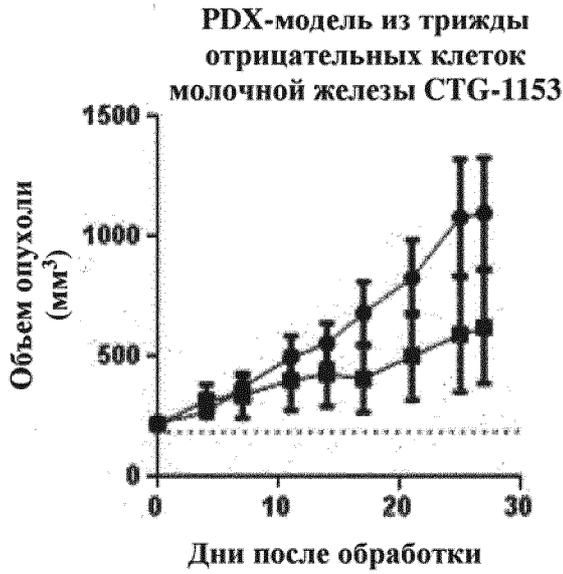


**ФИГ. 24С**

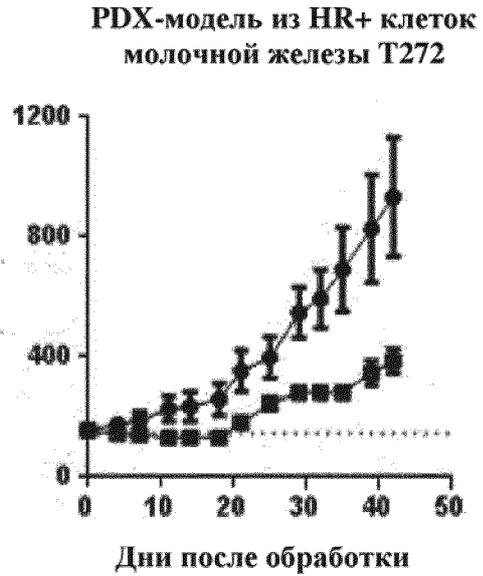
**PDX-модель из клеток  
яичника CTG-1086**



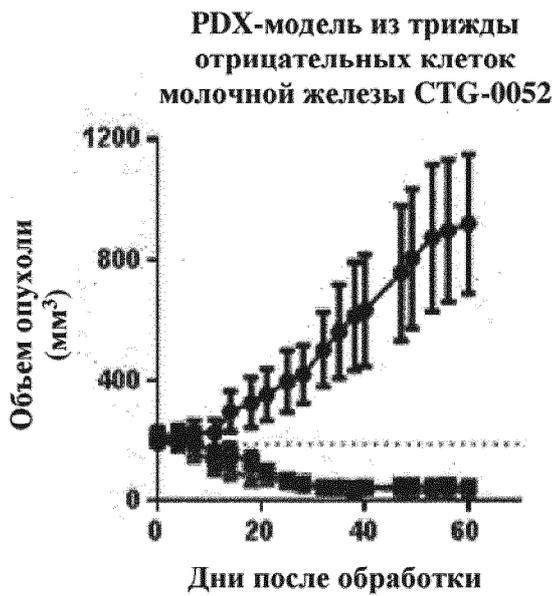
**ФИГ. 24D**



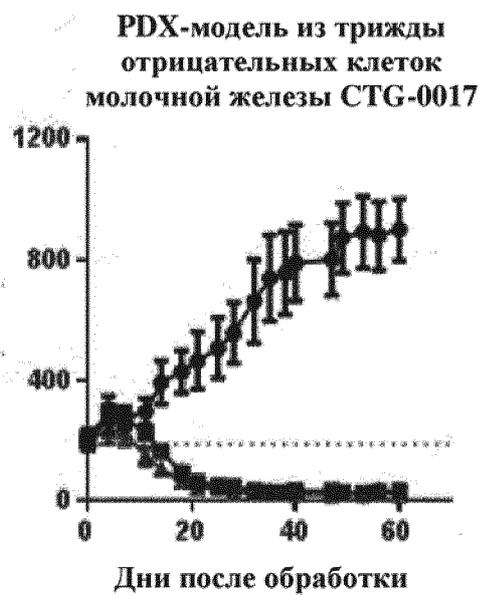
ФИГ. 24Е



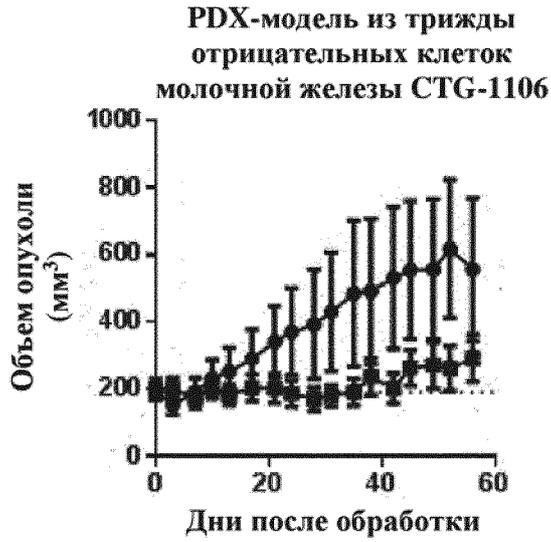
ФИГ. 24F



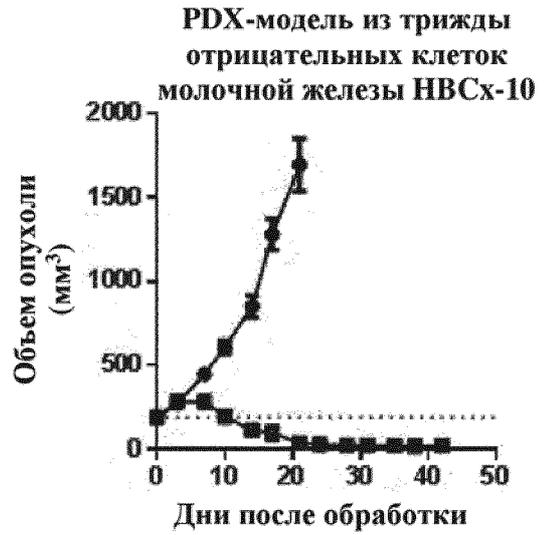
ФИГ. 24G



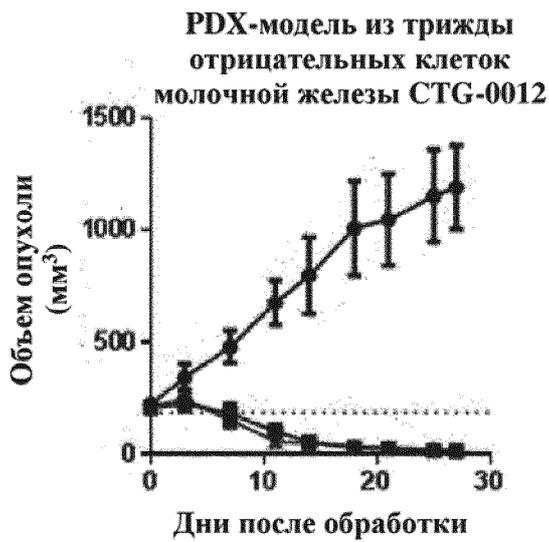
ФИГ. 24H



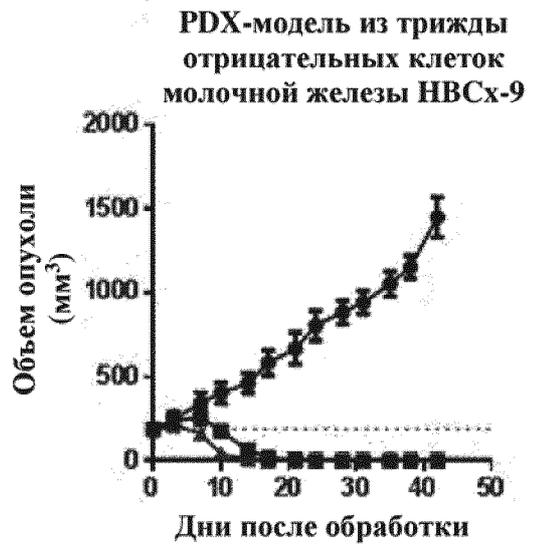
ФИГ. 24I



ФИГ. 24J

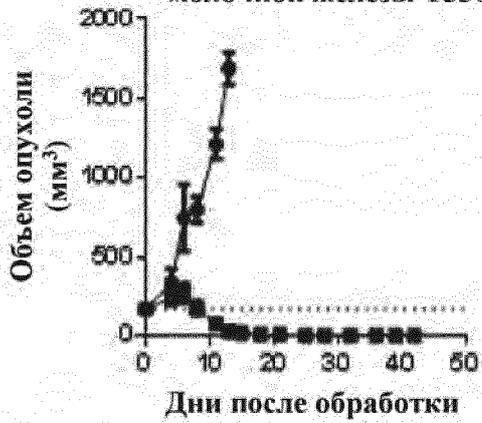


ФИГ. 24K



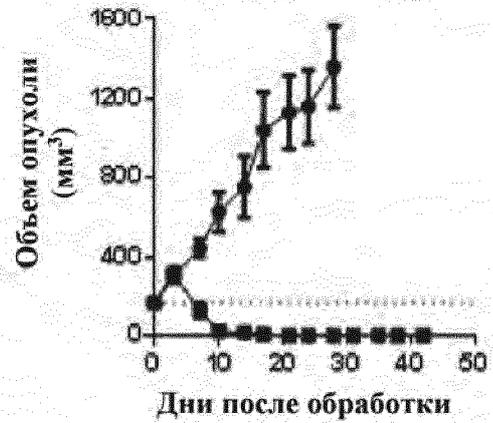
ФИГ. 24L

**PDX-модель из трижды отрицательных клеток молочной железы T330**



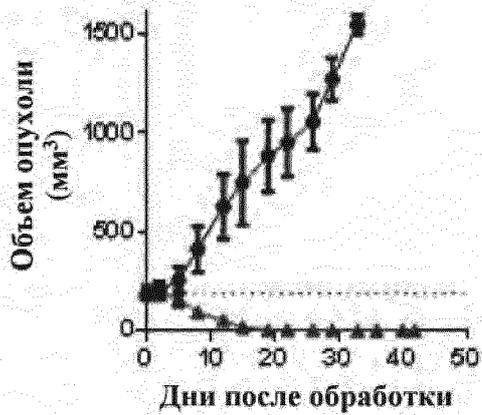
**ФИГ. 24М**

**PDX-модель из HR+ клеток молочной железы T168**

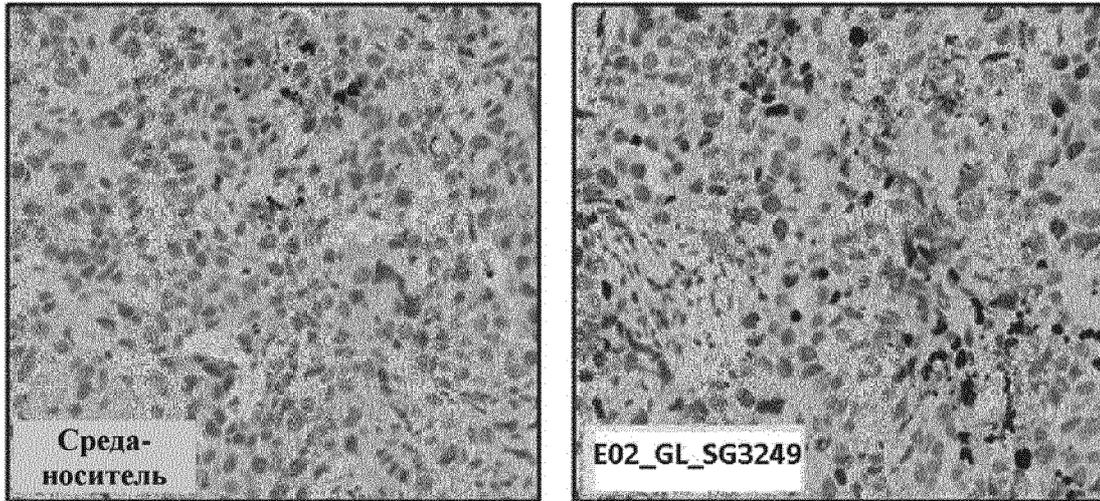


**ФИГ. 24N**

**PDX-модель из Her2+ клеток молочной железы T226**

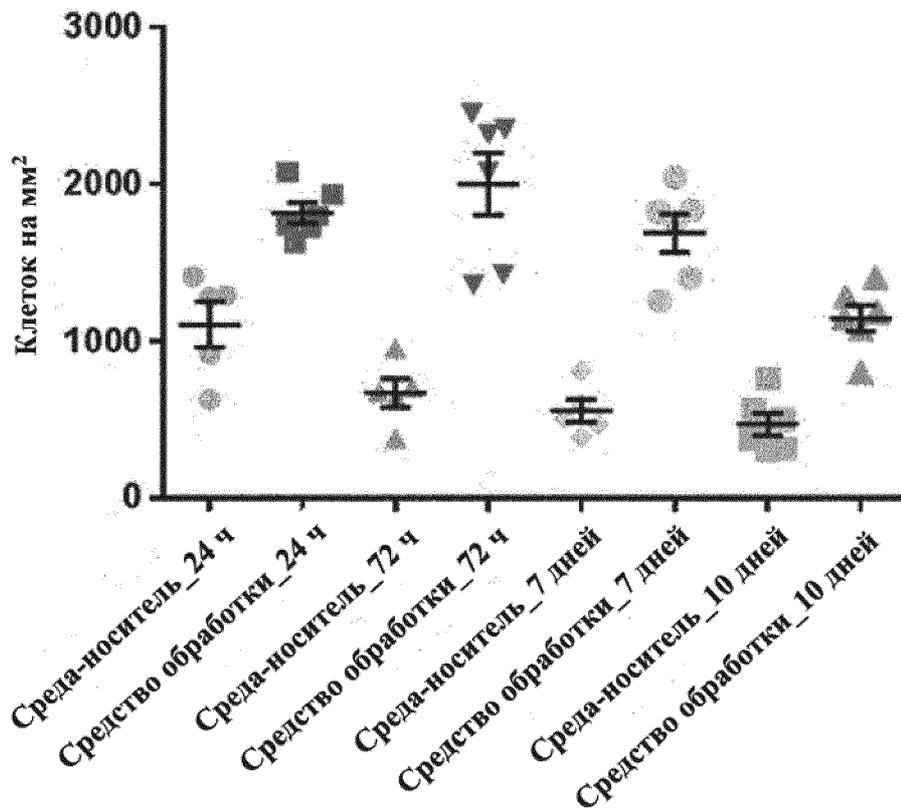


**ФИГ. 24О**



ФИГ. 25А

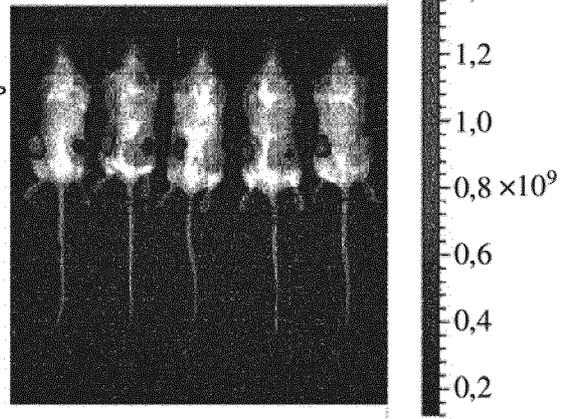
Положительных по gH2AX клеток на  $\text{мм}^2$  в пределах исследуемой области ткани (+/- S.E.M.)



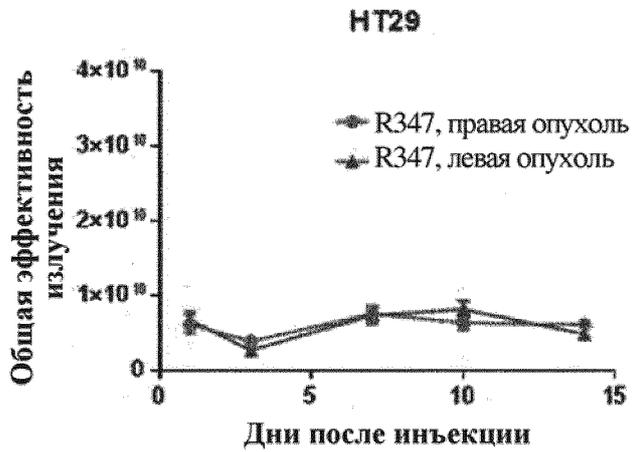
ФИГ. 25В



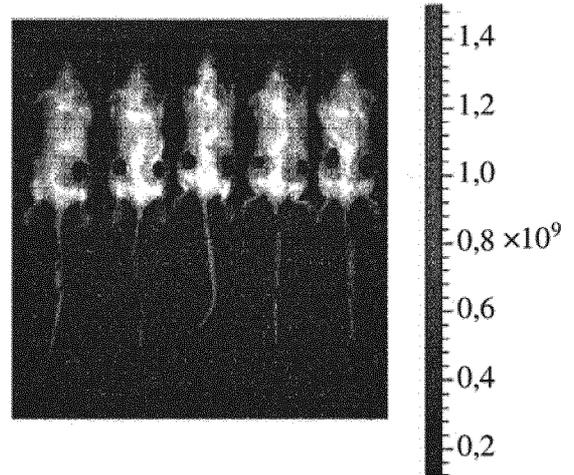
ФИГ. 26А



ФИГ. 26В



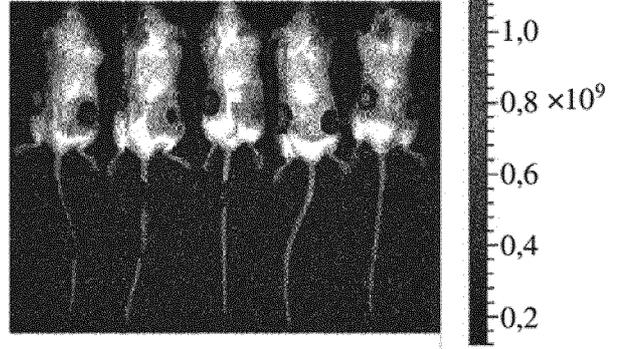
ФИГ. 26С



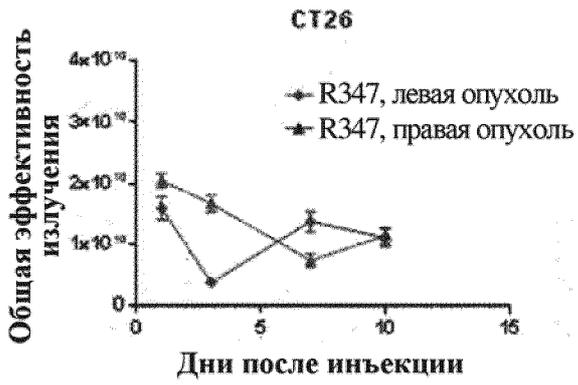
ФИГ. 26D



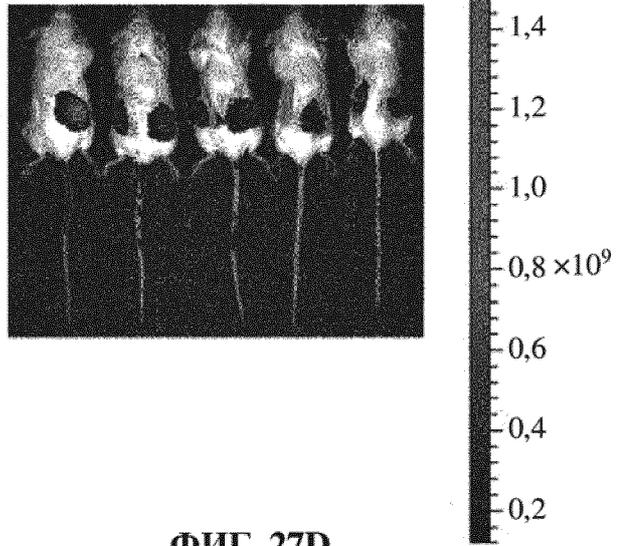
**ФИГ. 27А**



**ФИГ. 27В**



**ФИГ. 27С**



**ФИГ. 27D**

ID клона	FW1 тяжелой цепи	CDR1 тяж. цепи	FW2 тяжелой цепи
ZY0EPQ-E02	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSF	GYAWN...	WIRQPPGKGLEWIG
ZY0EQD-E02	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCTVYGGSF	GYAWN...	WIRQPPGRGLEWIG
ZY0EP0-C07	QVQLVESGGVLVKPGGSLRSLCAASGFTLS	DYYMS...	WIRQAPGMGLEWVS
ZY0EOB-F05	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIS	SGGYWS..	WIRQHPGKGLEWIG
ZY0EO5-E07	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIS	SGGYWS..	WIRQHPGKGLEWIG

CDR2 тяжелой цепи	FW3 тяжелой цепи	CDR3 тяжелой цепи	FW4 тяж. цепи
EIN.....HSGSTNYNPSLKS	RVTILVDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	NLYNWNL.....DS	WGQGLTVTVSS
EIN.....HSGSTSYNPSLKS	RITISIDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	VLYNWNV.....DS	WGQGLTVTVSS
YISS.....SGSTIYYTDSVKG	RFTISRDSAKNSLYLQMNSL..RAEDTAVYYCAR	DGVGF.....DY	WGQGLTVTVSS
NIY.....YSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLNSV..TAADTAVYYCAT	EKALATVTPSGYENYYTV.....DV	WGQGTIVTVSS
NIY.....YSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	EKALASVIPSGYENYYV.....DV	WGQGTIVTVSS

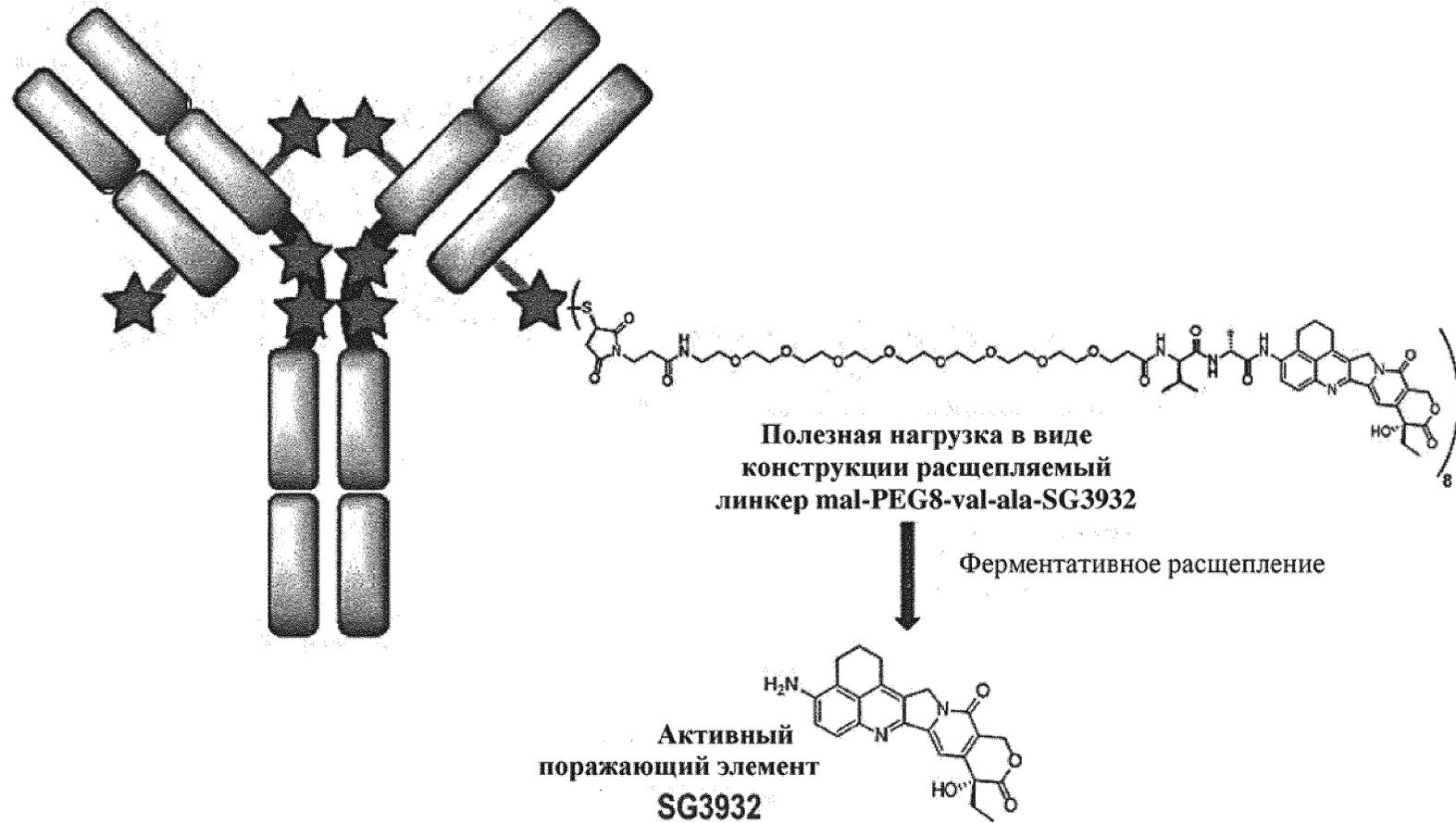
ФИГ. 28А

ID клона	FW1 легкой цепи	CDR1 легкой цепи	FW2 легкой цепи
ZY0EQD-E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASQ.....DIRNDVG	WYQQKPGKAPKRLIY
ZY0EPQ-E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASQ.....GIRNDLG	WYQQKPGRAPKRLIY
ZY0EP0-C07	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQS.....VSSSYLA	WYQQKPGQSPRLIY
ZY0EO5-E07	DIQLTQSPSFLSASVGGRTTTC	WASQ.....GIAGYLA	WYQQKPGKAPKLLIY
ZY0EOB-F05	DIQLTQSPSFLSASVGDRTTTC	WASQ.....GISSYLA	WYQQKPGKAPKLLIY

CDR2 легк. цепи	FW3 легкой цепи	CDR3 легкой цепи	FW4 легкой цепи
AA.....SRLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYP.....RT	FGQGTKVEI...K
VA.....SSLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYP.....RT	FGQGTKVEI...K
AA.....SSRAT	GIPDRFSGSGSG..TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPL.....YT	FGQGTKLEI...K
AA.....STLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QHLNSYP.....LT	FGGGTKVEI...K
AA.....STLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QHLNSYP.....LT	FGGGTKVEI...K

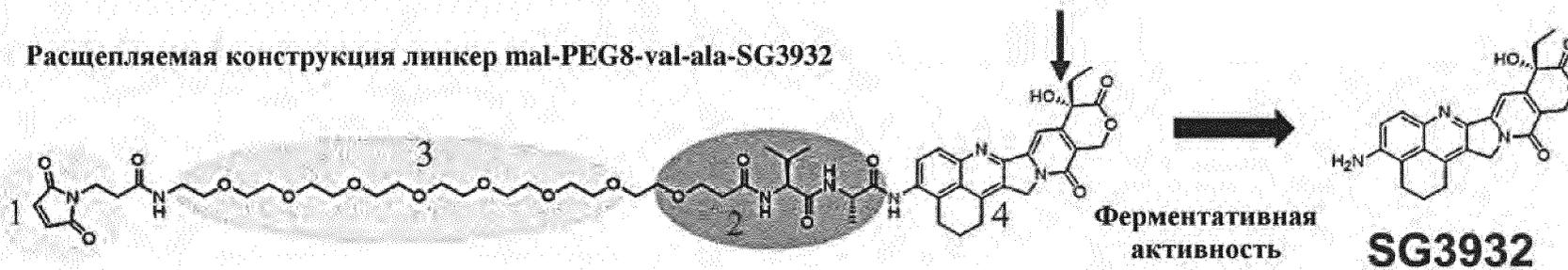
ФИГ. 28В

E02-GL-SG3932: TOP1i-ADC, нацеливающийся на B7-H4



ФИГ. 29А

Расщепляемая конструкция линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932

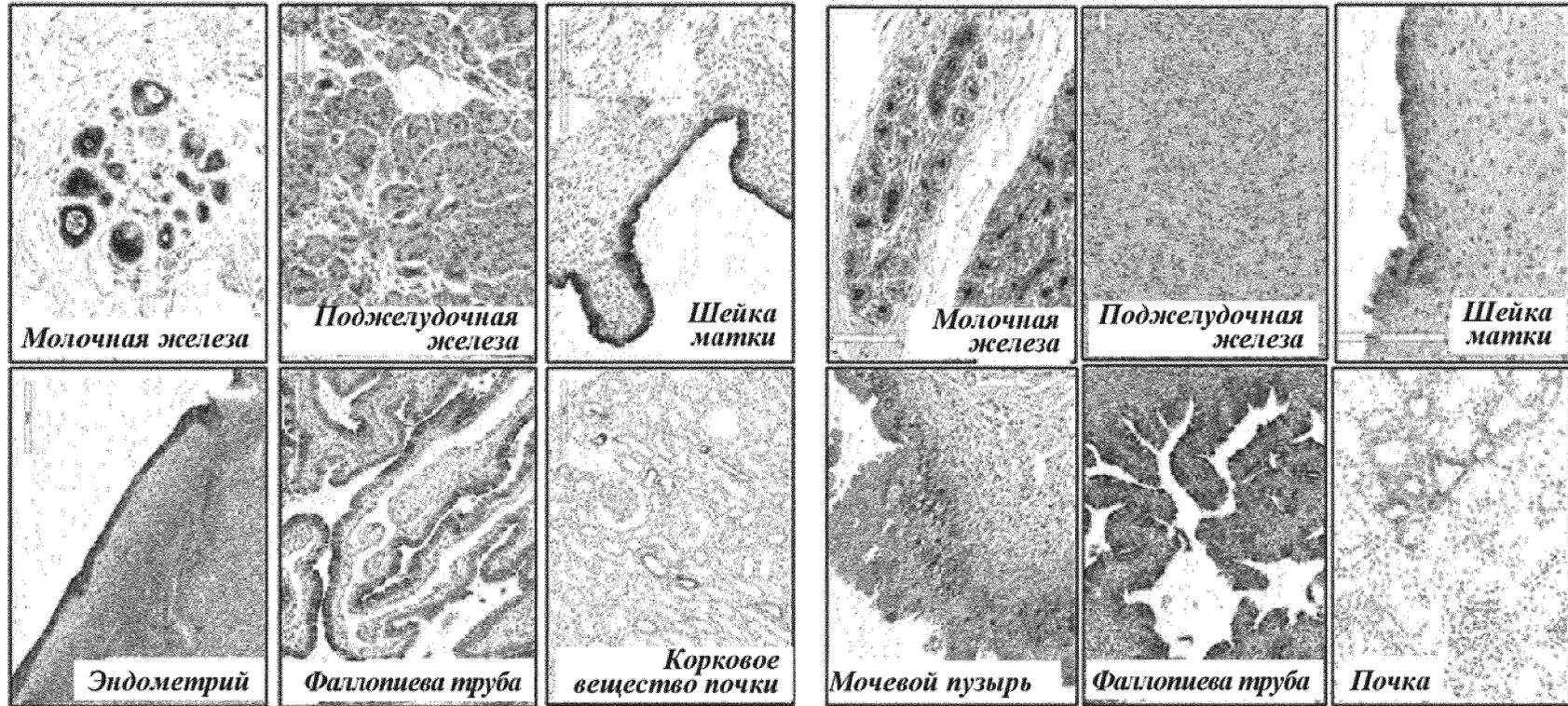


- Удерживающий
- 1 конец для конъюгирования
- 2 Высвобождающий фактор
- 3 PEG
- 4 Поражающий элемент
- ↑ Лактоновый переключатель

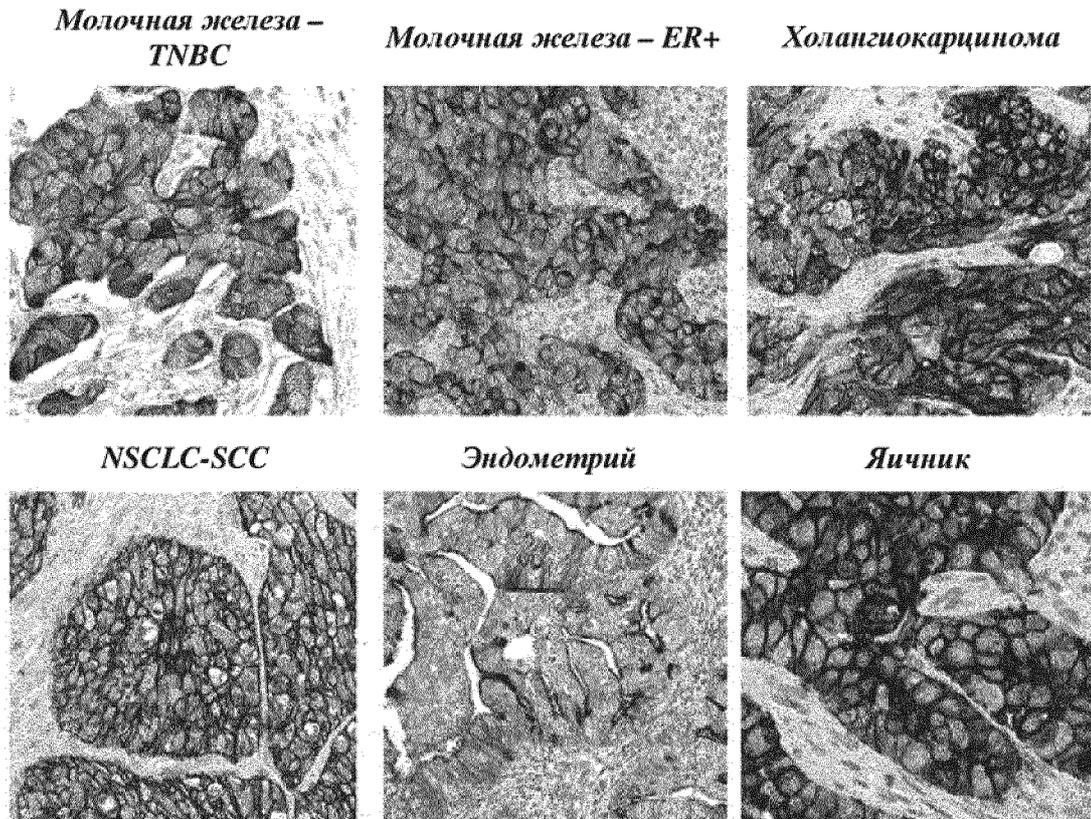
ФИГ. 29В

Человек

Яванский макак



ФИГ. 30



ER: рецептор эстрогена;

NSCLC-SCC: немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточная карцинома;

TNBC: трижды отрицательный рак молочной железы.

**ФИГ. 31**

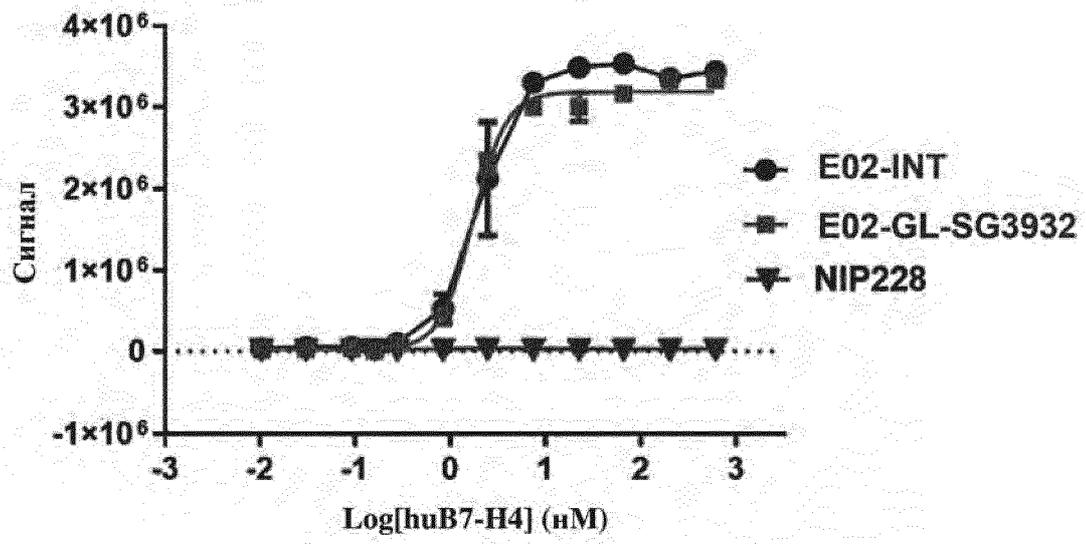
Глобальное выравнивание белков. Эталонная молекула: hB7-H4 (VTCN1), участок 1-282  
 Последовательности: 5. Матрица замен: BLOSUM 62

Представление последовательностей: формат сходства,  
 цветом обозначены несовпадения

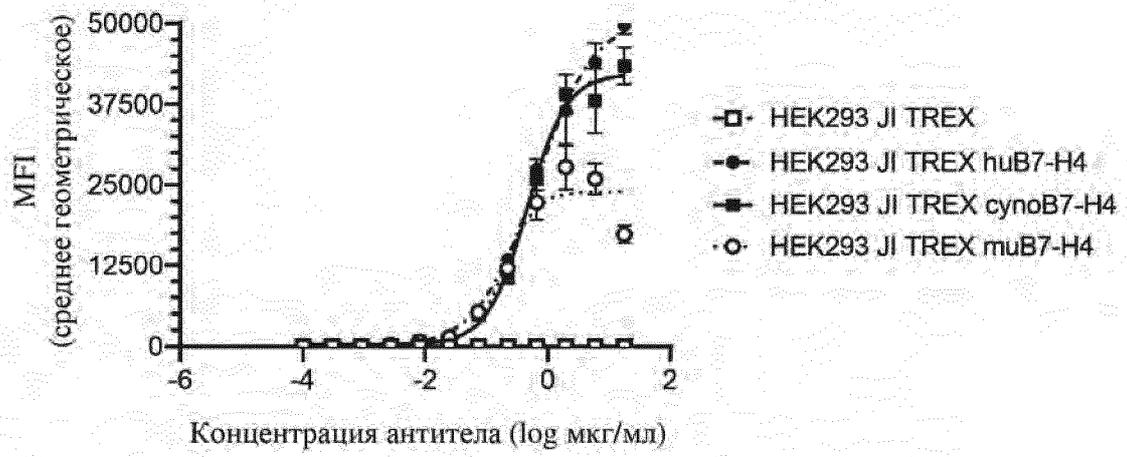
hB7-H4 (VTCN1)	1	maslgqilfwsiiiiiilagaiaaliigfgisgrhsitvttvasagnigedgilsctfepdiklsdiviqwlkegvlglv
cyB7-H4 (VTCN1)	1	maslgqilfwsiiiiiilagaiaaliigfgisgrhsitvttvasagnigedgilsctfepdiklsdiviqwlkegvlglv
rhB7-H4 (VTCN1)	1	maslgqilfwsiiiiiilagaiaaliigfgisgrhsitvttvasagnigedgilsctfepdiklsdiviqwlkegvlglv
mB7-H4 (VTCN1)	1	maslgqilfwsiiiiiilagaiaaliigfgisgrhsitvttvasagnigedgilsctfepdiklsdiviqwlkegvlglv
rB7-H4 (VTCN1)	1	maslgqilfwsiiiiiilagaiaaliigfgisgrhsitvttvasagnigedgilsctfepdiklsdiviqwlkegvlglv
hB7-H4 (VTCN1)	81	hefkegkdelseqdemfrgrtavfadqvivgnaslrirknvqltdagtykcyiitskgkgnanleyktgafsmpevndyn
cyB7-H4 (VTCN1)	81	hefkegkdelseqdemfrgrtavfadqvivgnaslrirknvqltdagtykcyiitskgkgnanleyktgafsmpevndyn
rhB7-H4 (VTCN1)	81	hefkegkdelseqdemfrgrtavfadqvivgnaslrirknvqltdagtykcyiitskgkgnanleyktgafsmpevndyn
mB7-H4 (VTCN1)	81	hefkegkdelseqdemfrgrtavfadqvivgnaslrirknvqltdagtykcyiitskgkgnanleyktgafsmpevndyn
rB7-H4 (VTCN1)	81	hefkegkdelseqdemfrgrtavfadqvivgnaslrirknvqltdagtykcyiitskgkgnanleyktgafsmpevndyn
hB7-H4 (VTCN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvdqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtinntyscmiendiakatgdikv
cyB7-H4 (VTCN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvdqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtinntyscmiendiakatgdikv
rhB7-H4 (VTCN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvdqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtinntyscmiendiakatgdikv
mB7-H4 (VTCN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvdqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtinntyscmiendiakatgdikv
rB7-H4 (VTCN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvdqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtinntyscmiendiakatgdikv
hB7-H4 (VTCN1)	241	teseikrrshlqlnksalcv-ssffaiswallplapyimk
cyB7-H4 (VTCN1)	241	teseikrrshlqlnksalcv-ssffaiswallplapyimk
rhB7-H4 (VTCN1)	241	teseikrrshlqlnksalcv-ssffaiswallplapyimk
mB7-H4 (VTCN1)	241	teseikrrshlqlnksalcv-ssffaiswallplapyimk
rB7-H4 (VTCN1)	241	teseikrrshlqlnksalcv-ssffaiswallplapyimk

ECD в рамках. h: человек; су: яванский макак;  
 rh: макак-резус; m: мышь; r: крыса

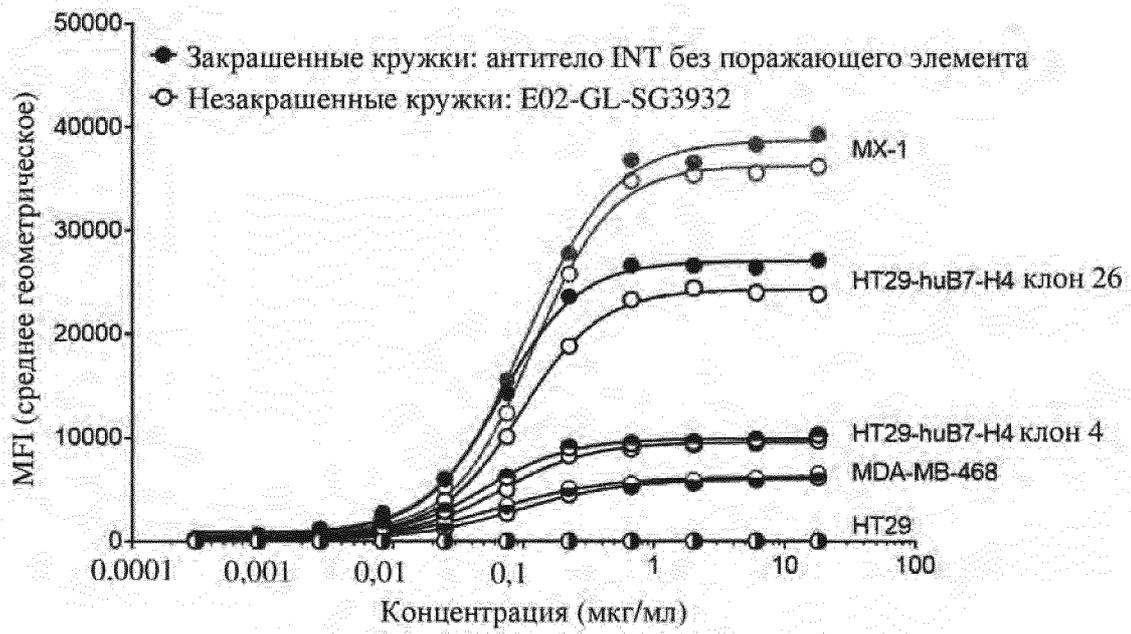
ФИГ. 32



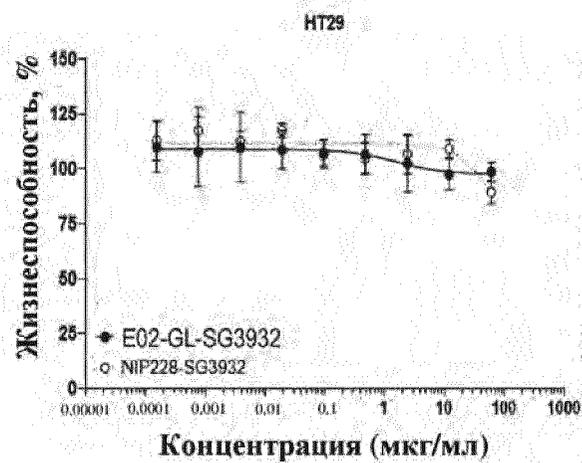
ФИГ. 33



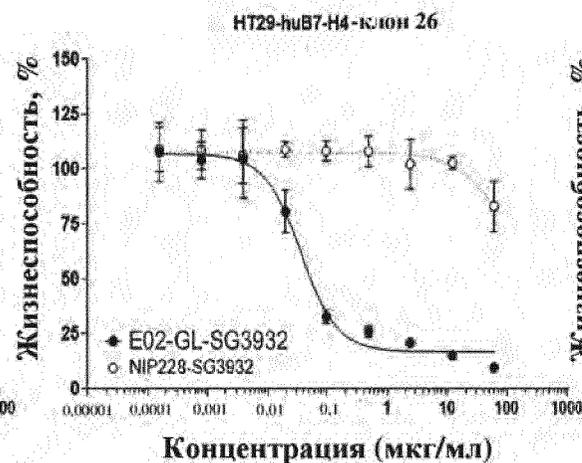
ФИГ. 34



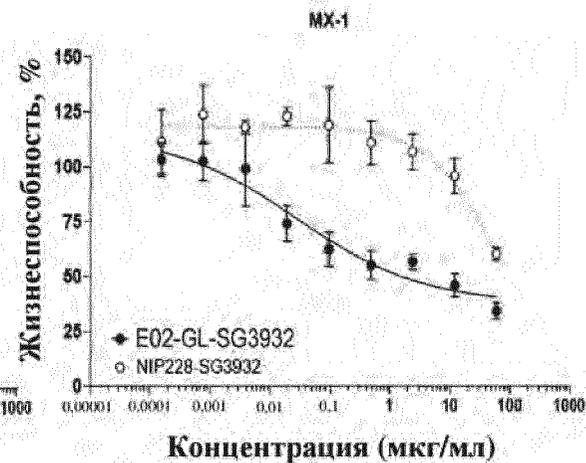
ФИГ. 35



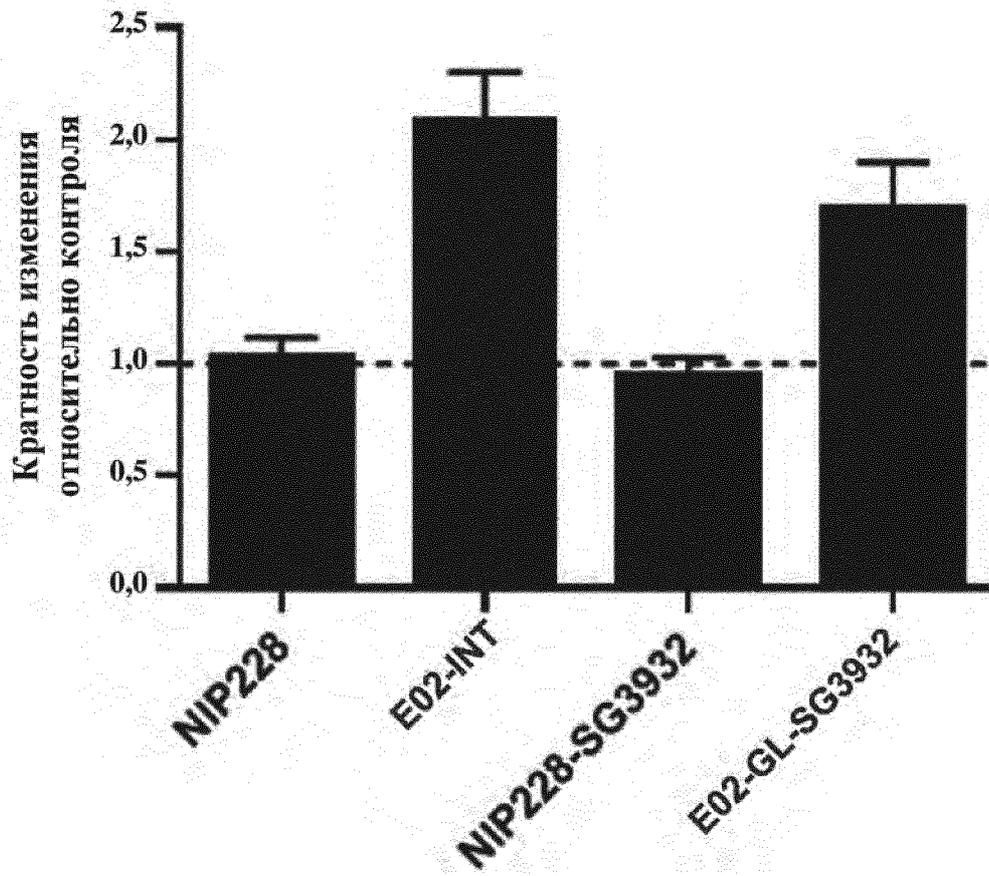
ФИГ. 36А



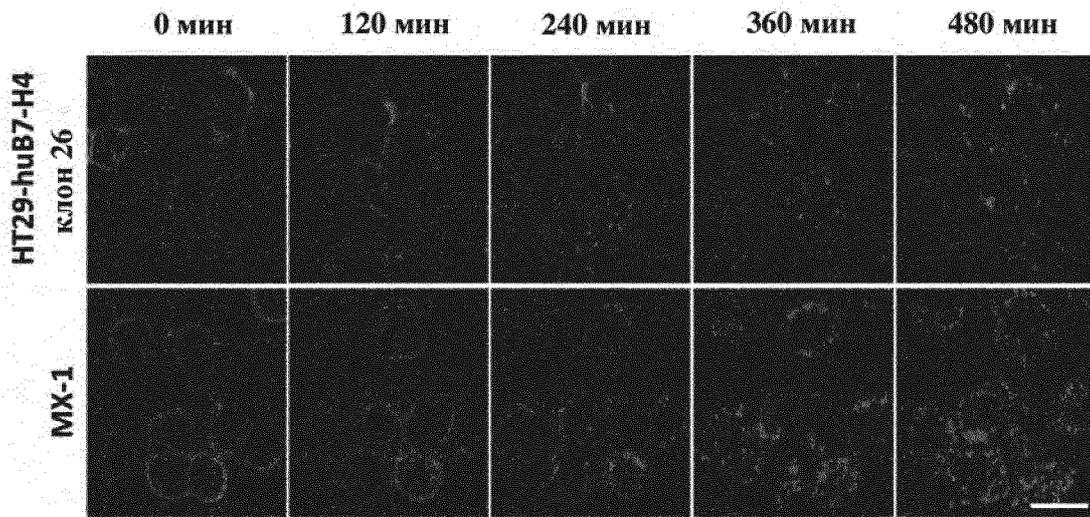
ФИГ. 36В



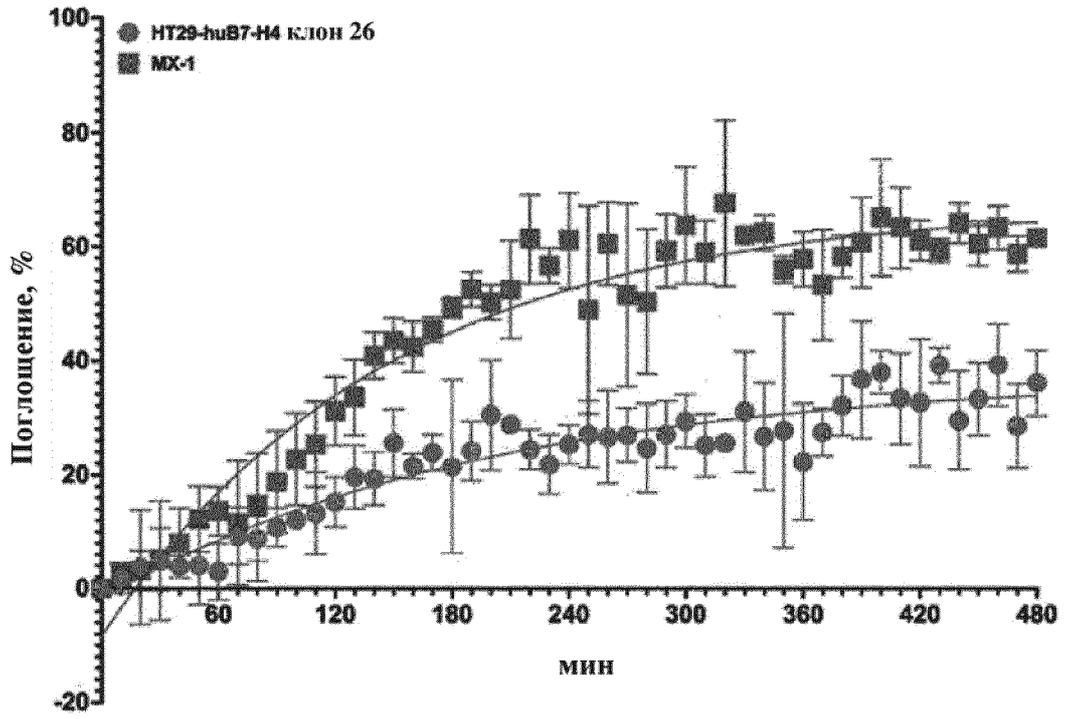
ФИГ. 36С



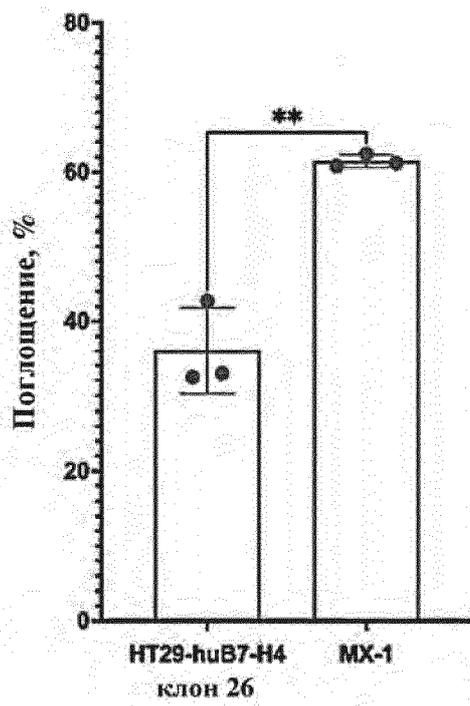
ФИГ. 37



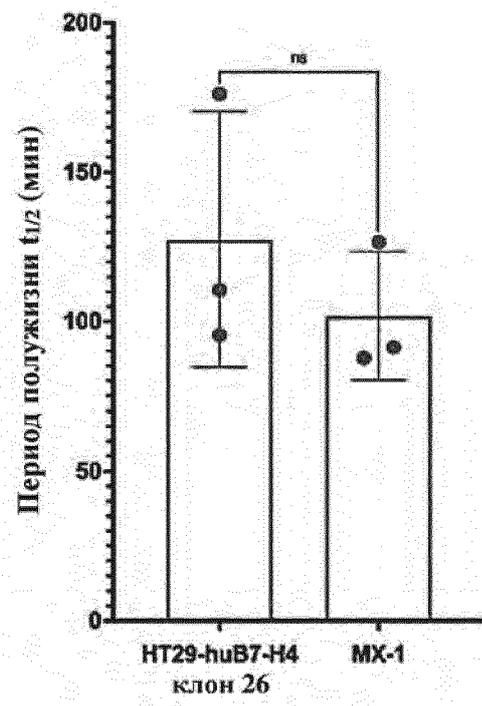
ФИГ. 38



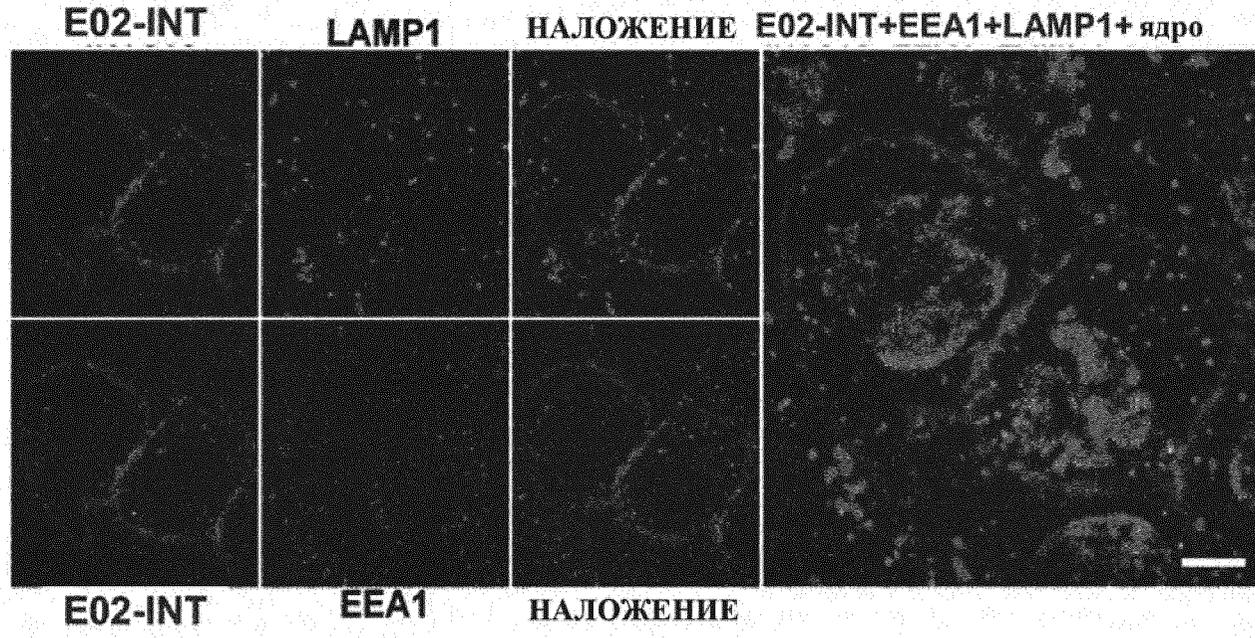
ФИГ. 39А



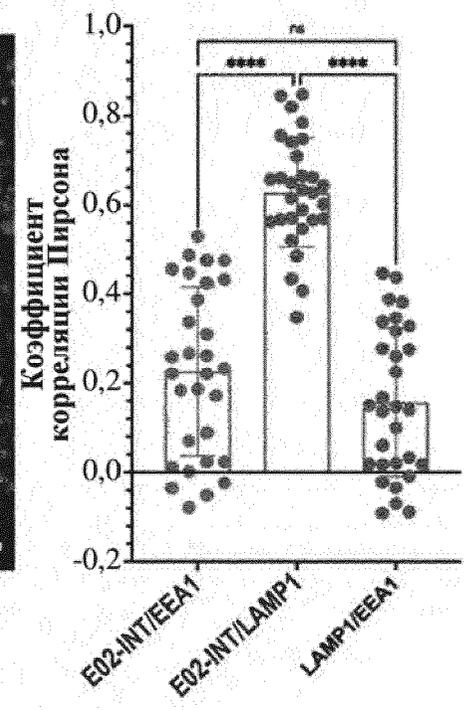
ФИГ. 39В



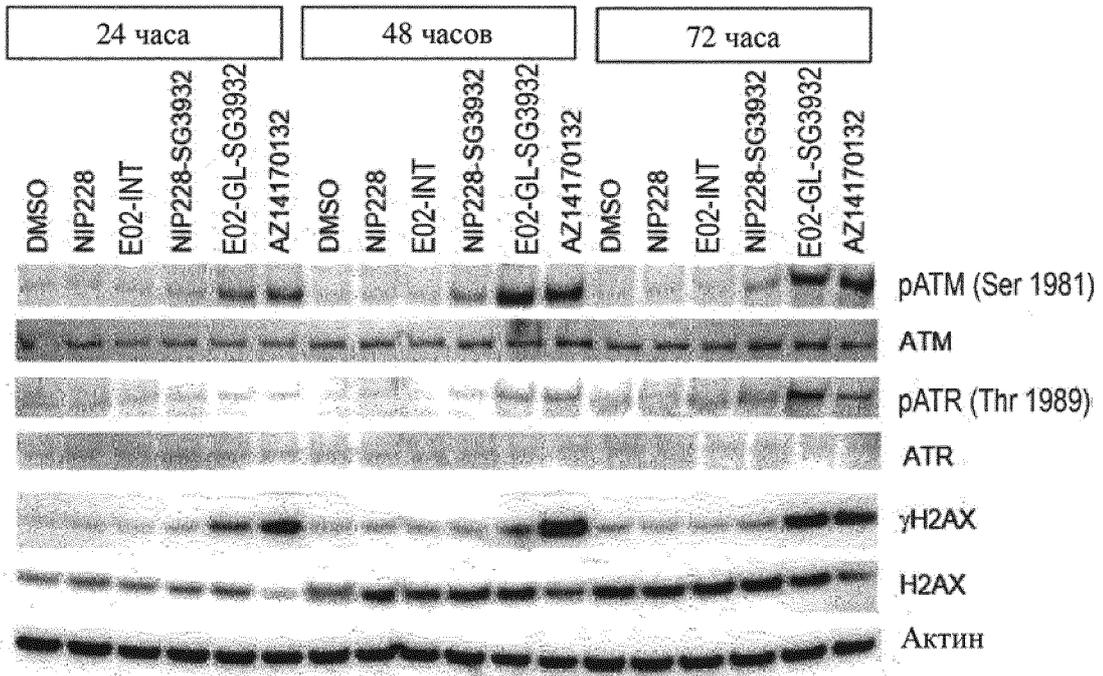
ФИГ. 39С



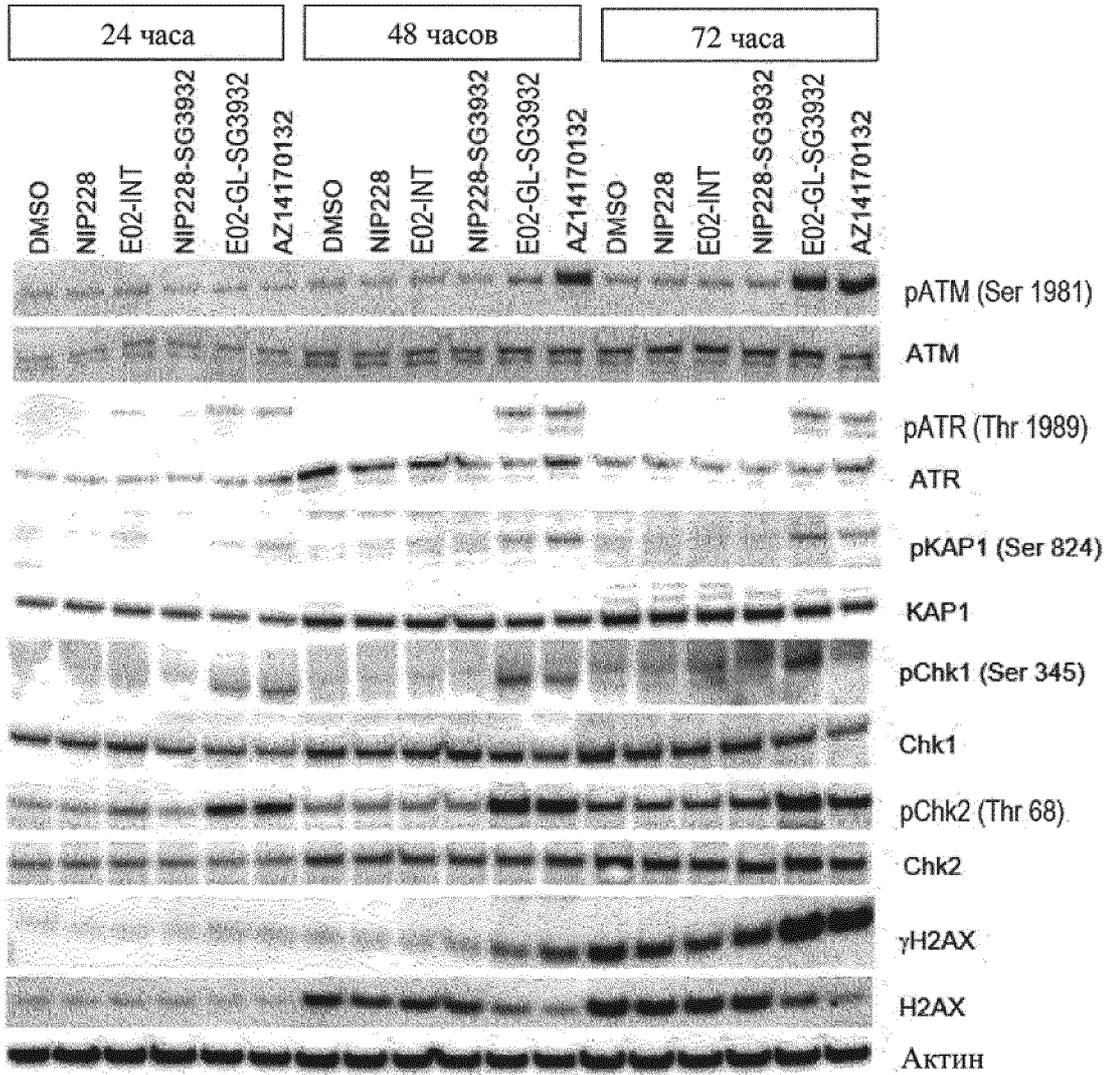
ФИГ. 40А



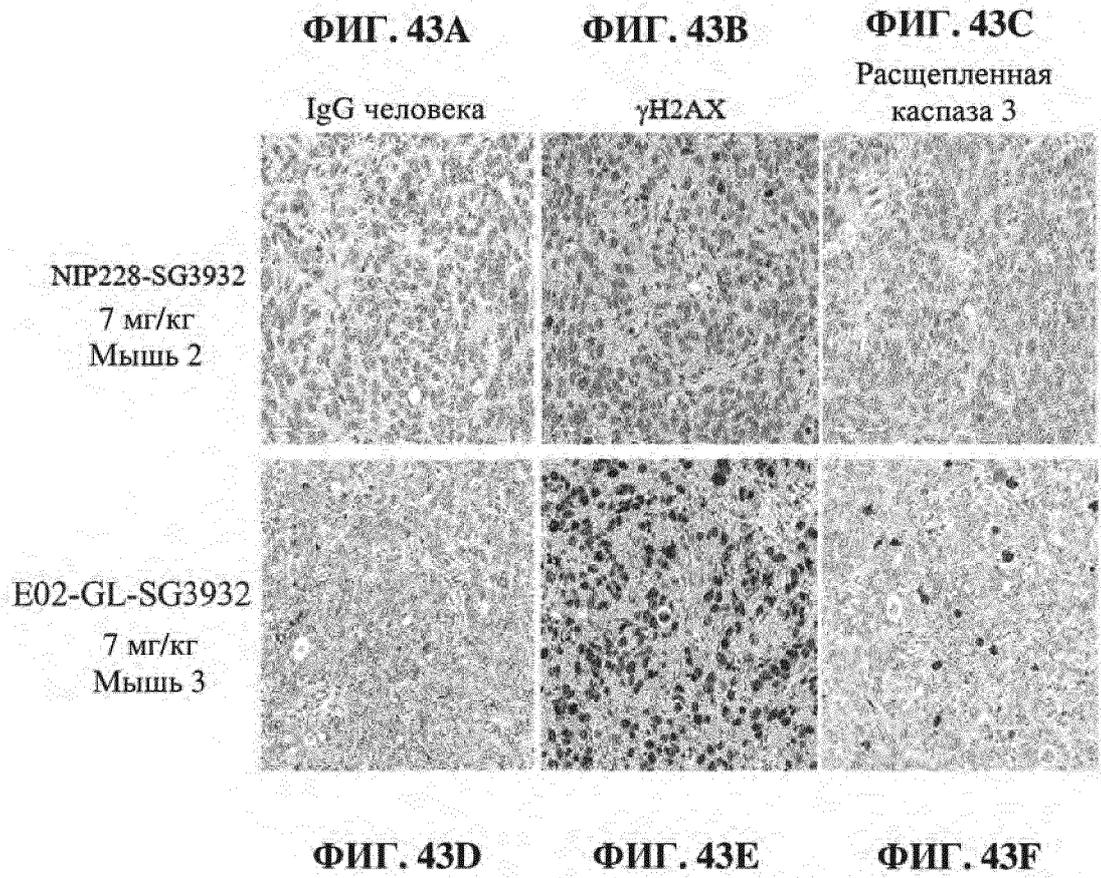
ФИГ. 40В



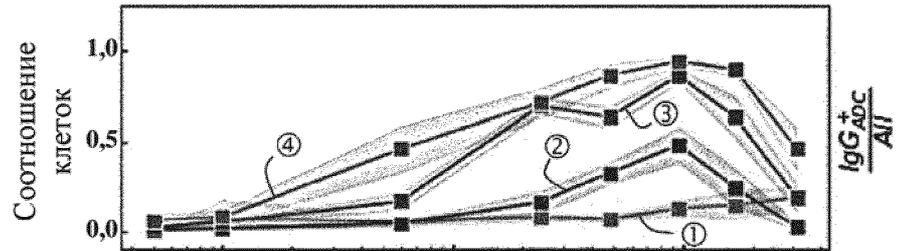
ФИГ. 41



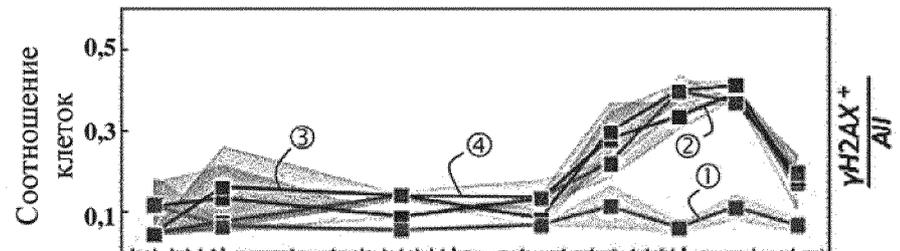
ФИГ. 42



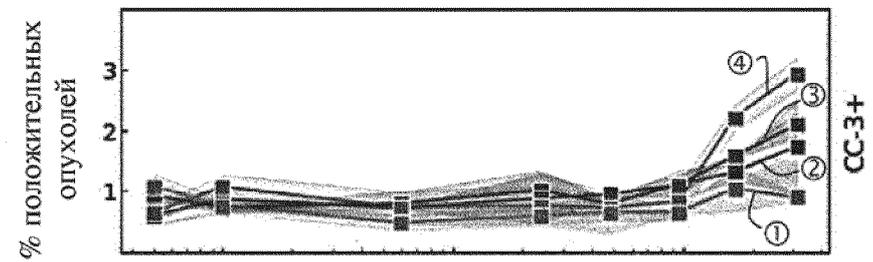
ФИГ. 44А



ФИГ. 44В



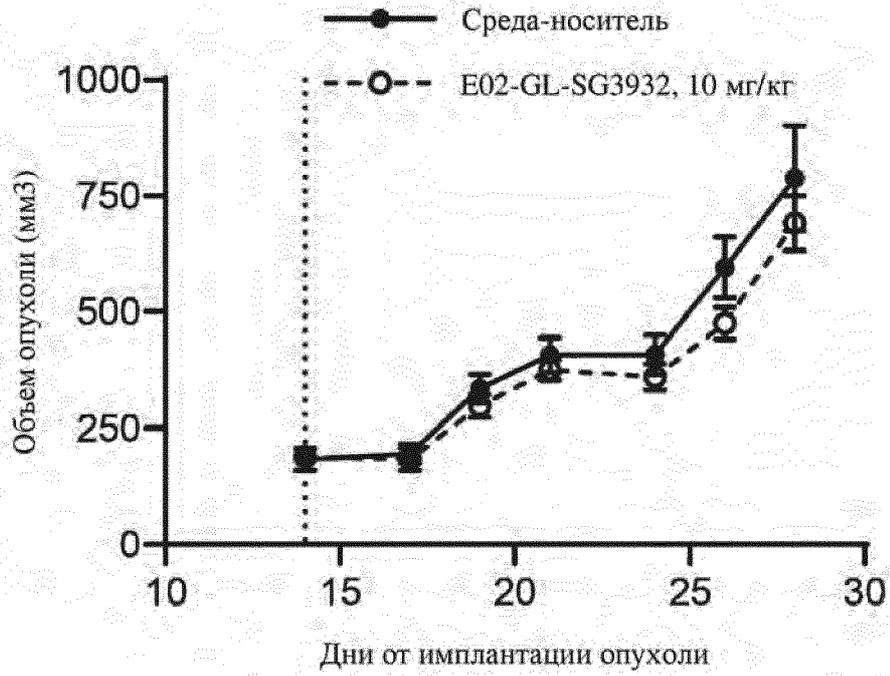
ФИГ. 44С



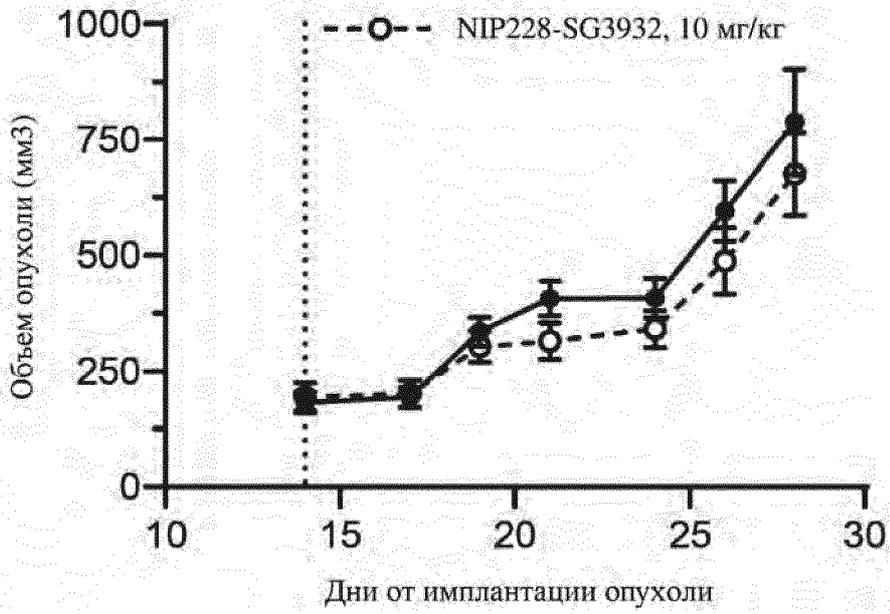
ФИГ. 44D



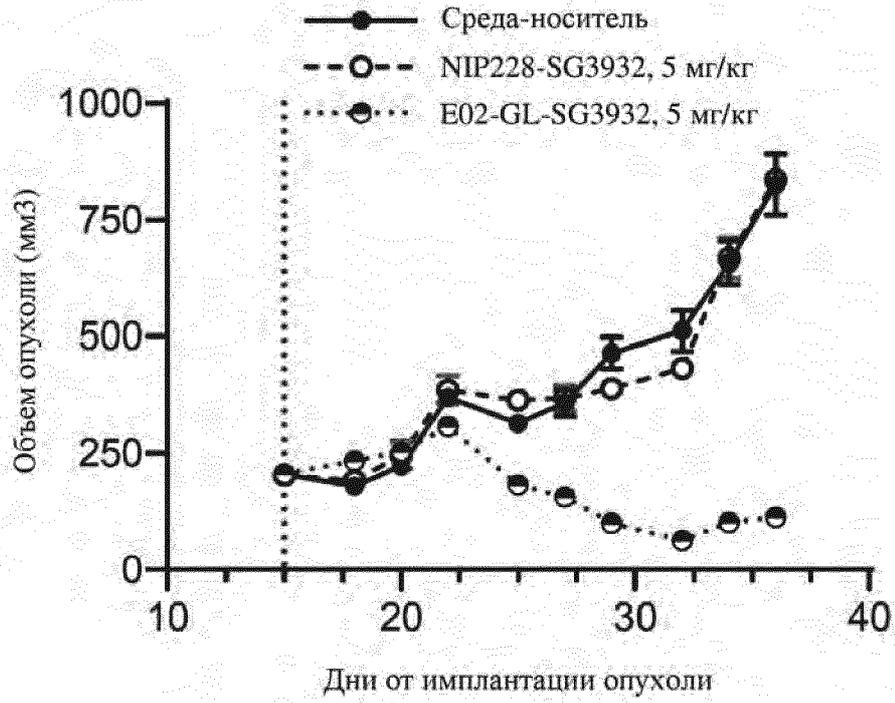
- ① — NIP228-SG3932, 7 мг/кг
- ② — E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг
- ③ — E02-GL-SG3932, 3,5 мг/кг
- ④ — E02-GL-SG3932, 7 мг/кг



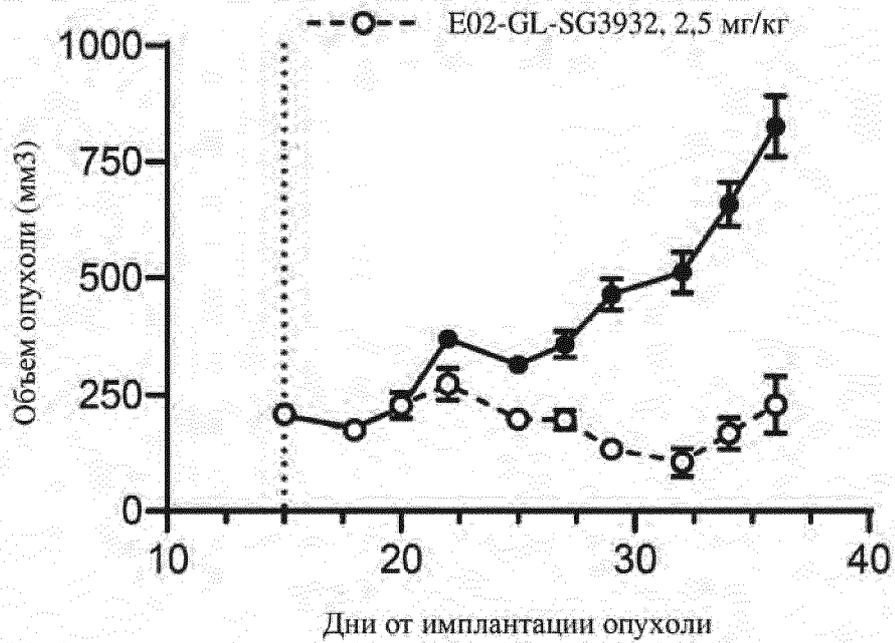
ФИГ. 45А



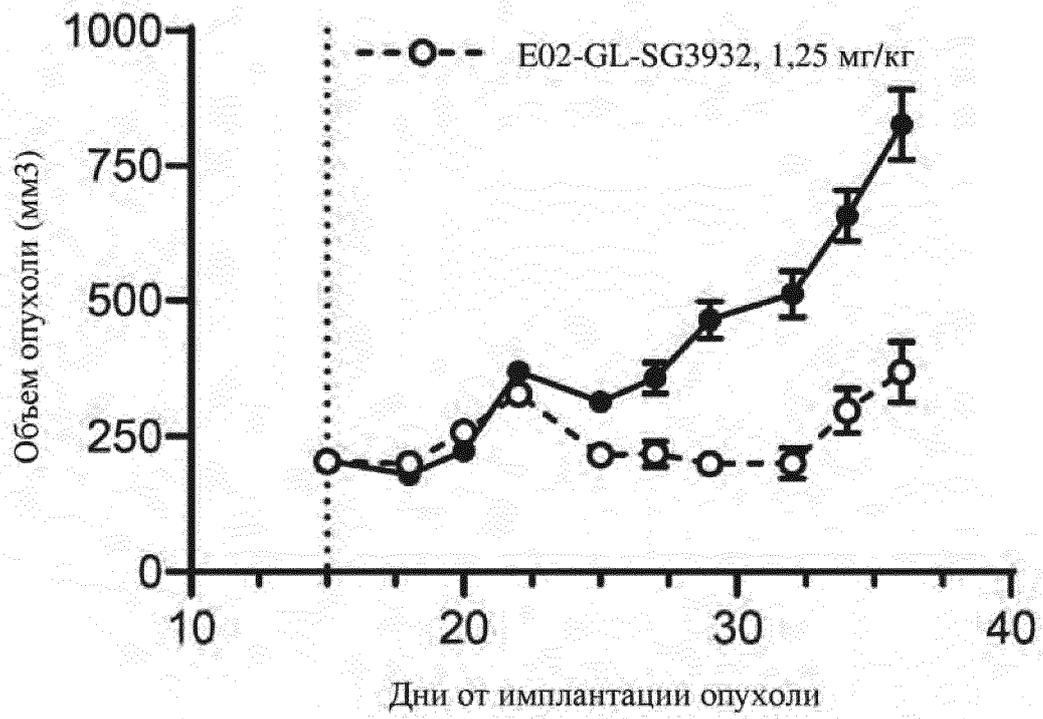
ФИГ. 45В



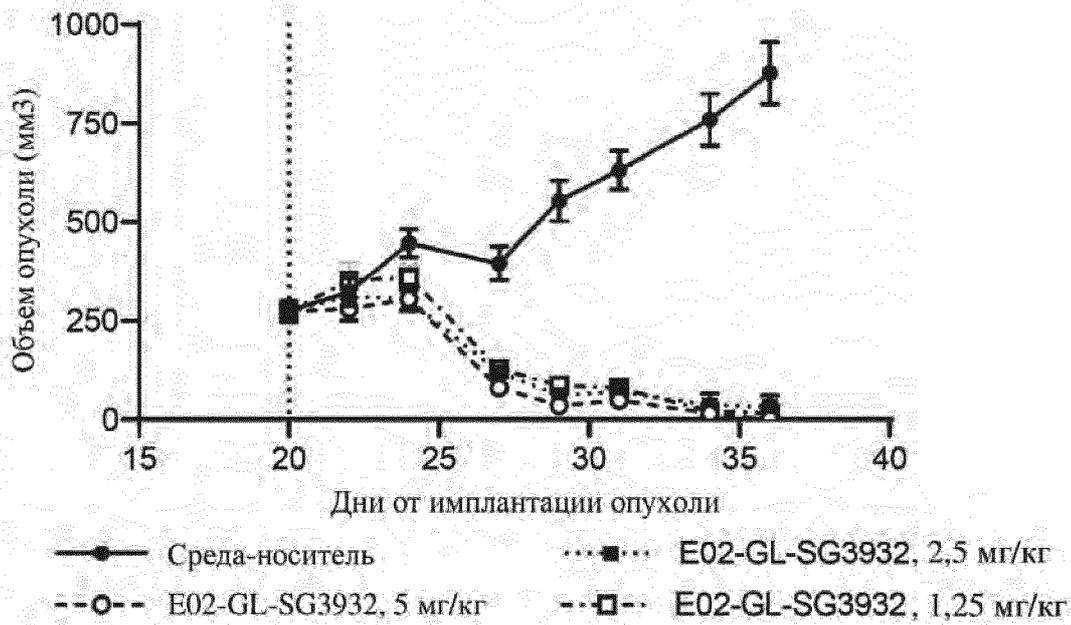
ФИГ. 46А



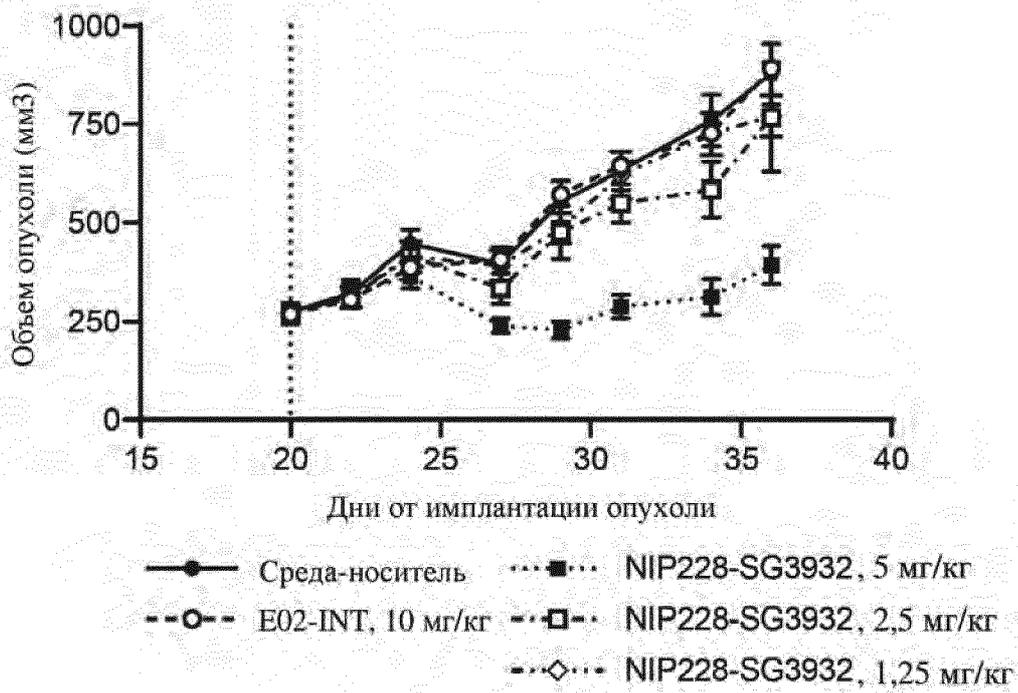
ФИГ. 46В



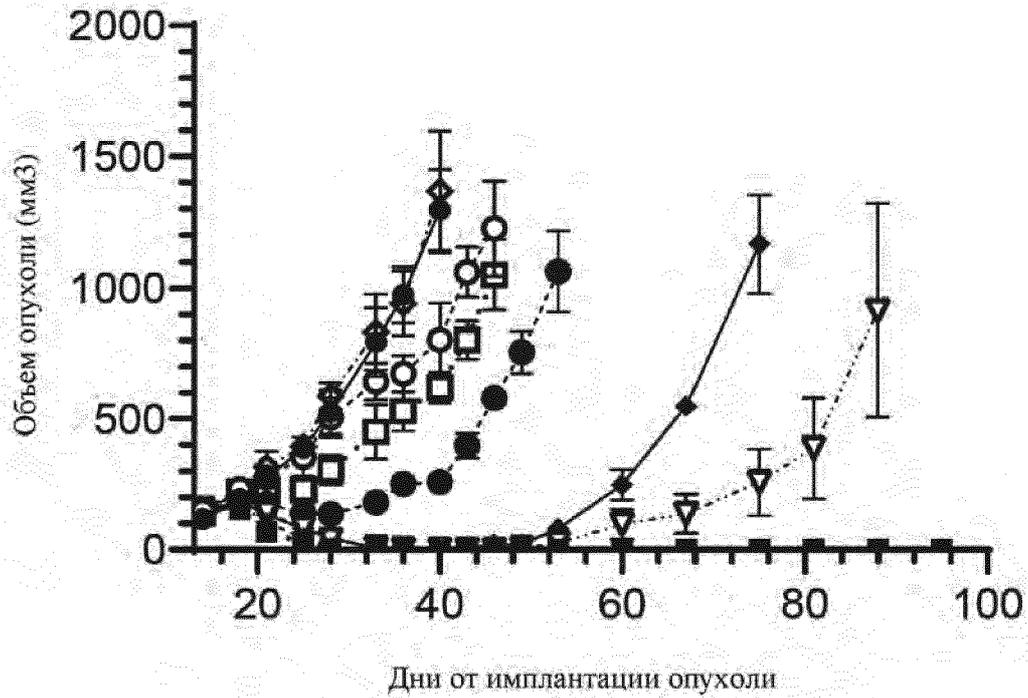
ФИГ. 46С



ФИГ. 47А

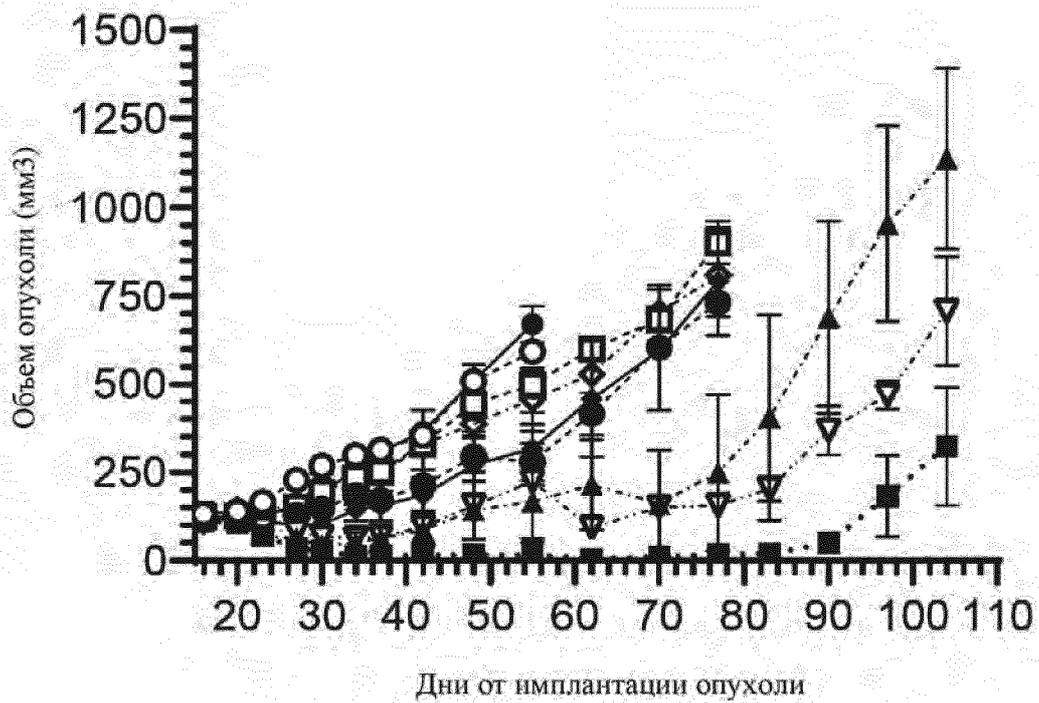


ФИГ. 47В



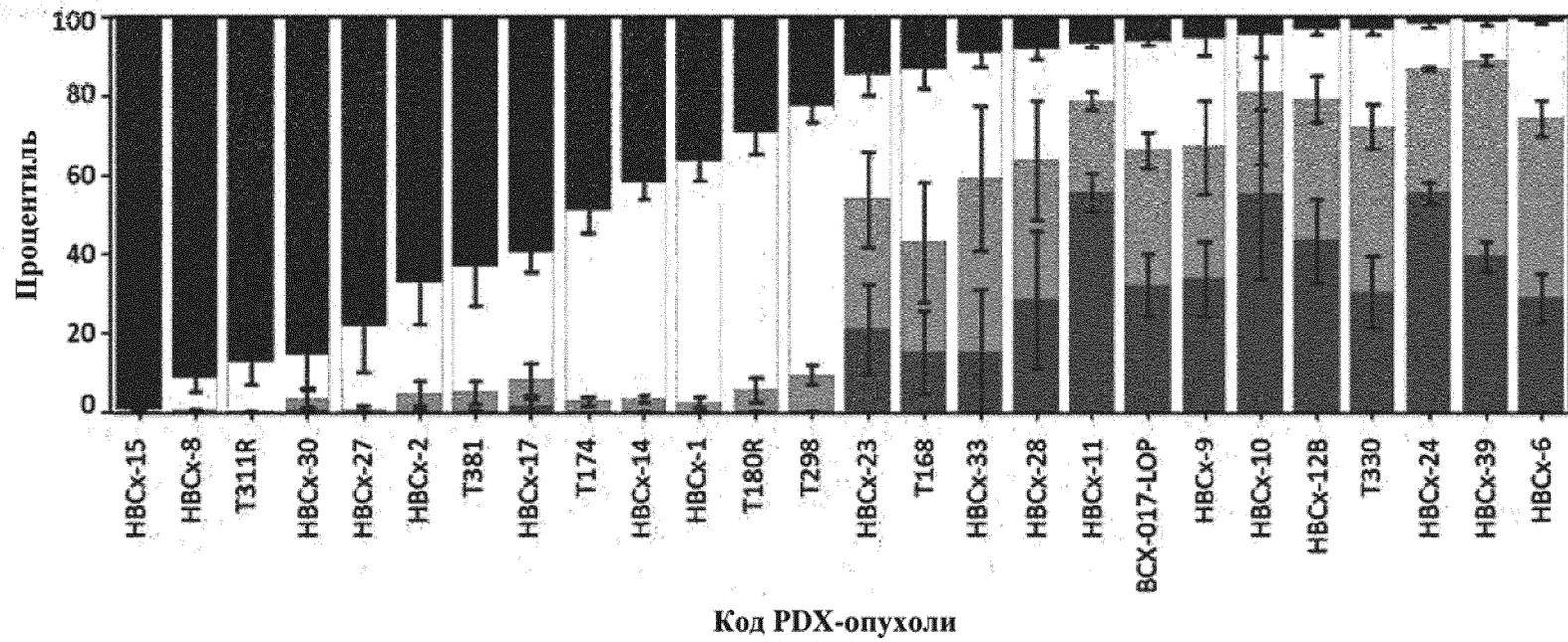
- Необработанные
- NIP228-SG3932 - 2 мг/кг
- ...■... E02-GL-SG3932 - 2 мг/кг
- ▲--- E02-GL-SG3932 - 1,5 мг/кг
- ▽--- E02-GL-SG3932 - 1 мг/кг
- ◆— E02-GL-SG3932 - 0,75 мг/кг
- E02-GL-SG3932 - 0,5 мг/кг
- ...□... E02-GL-SG3932 - 0,25 мг/кг
- ◇--- E02-GL-SG3932 - 0,125 мг/кг

ФИГ. 48

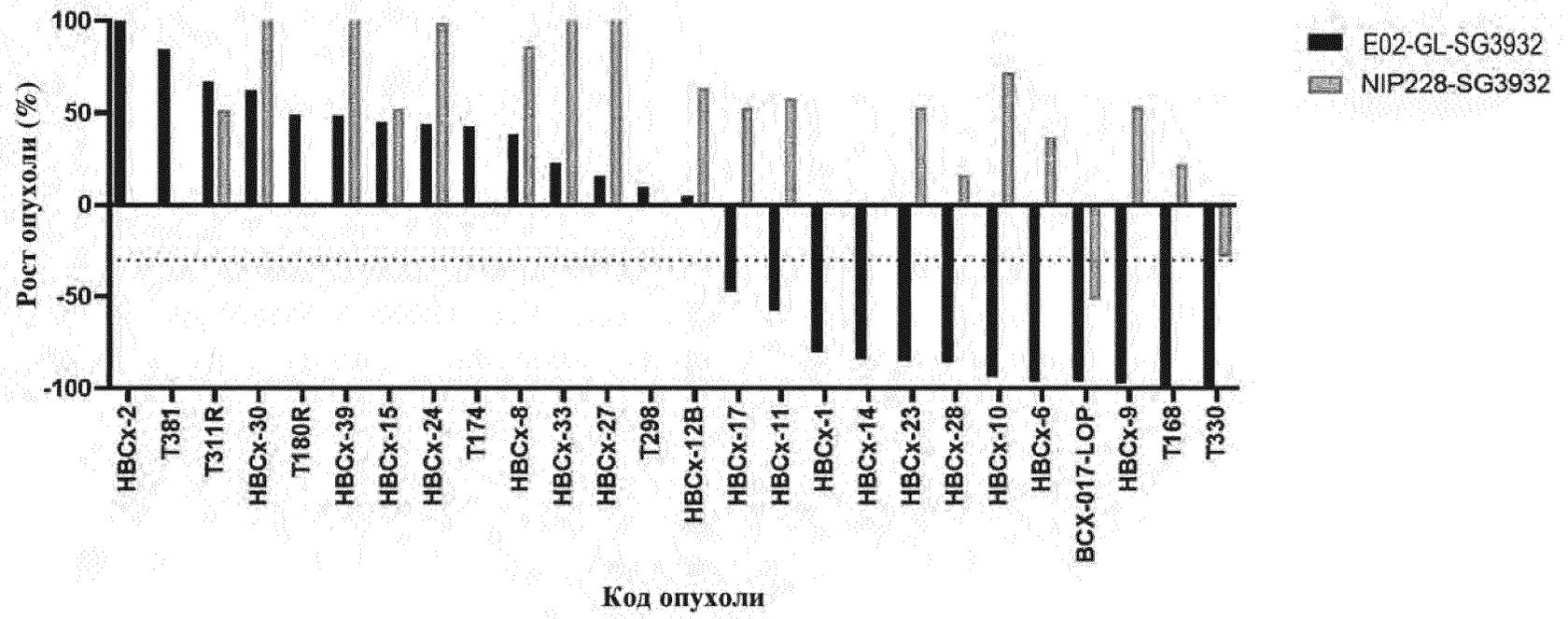


- Необработанные
- NIP228-SG3932 - 2 мг/кг
- E02-GL-SG3932 - 2 мг/кг
- ▲--- E02-GL-SG3932 - 1,5 мг/кг
- ▽--- E02-GL-SG3932 - 1 мг/кг
- ◆--- E02-GL-SG3932 - 0,75 мг/кг
- E02-GL-SG3932 - 0,5 мг/кг
- E02-GL-SG3932 - 0,25 мг/кг
- ◇--- E02-GL-SG3932 - 0,125 мг/кг

ФИГ. 49

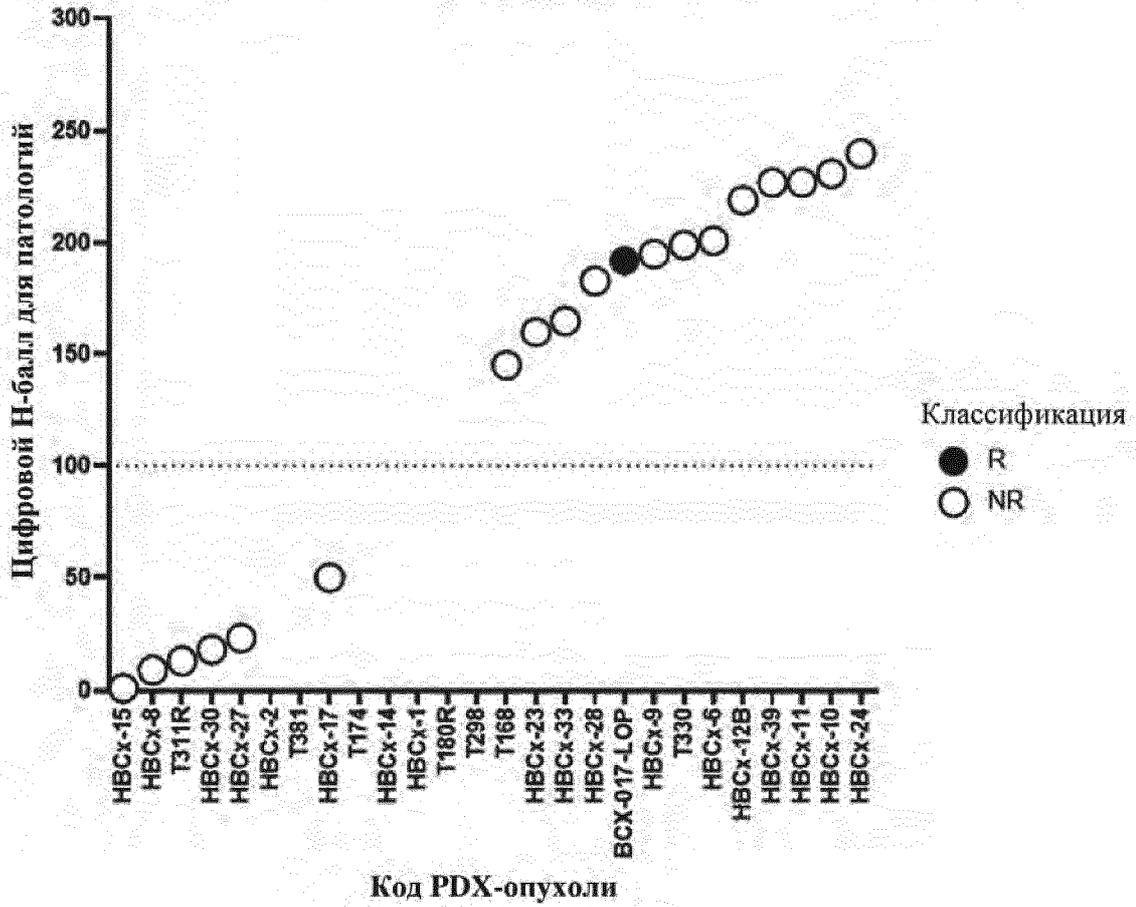


ФИГ. 50

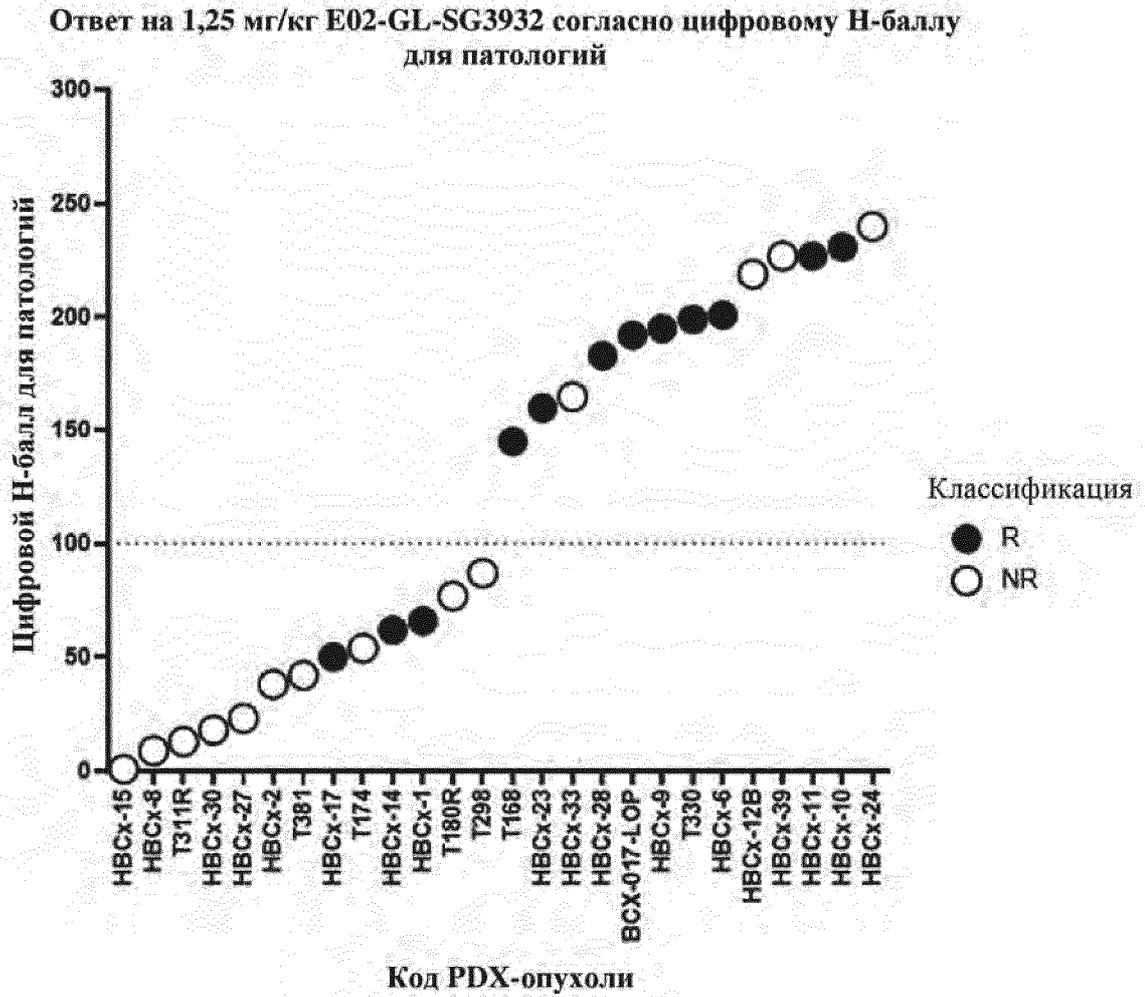


ФИГ. 51

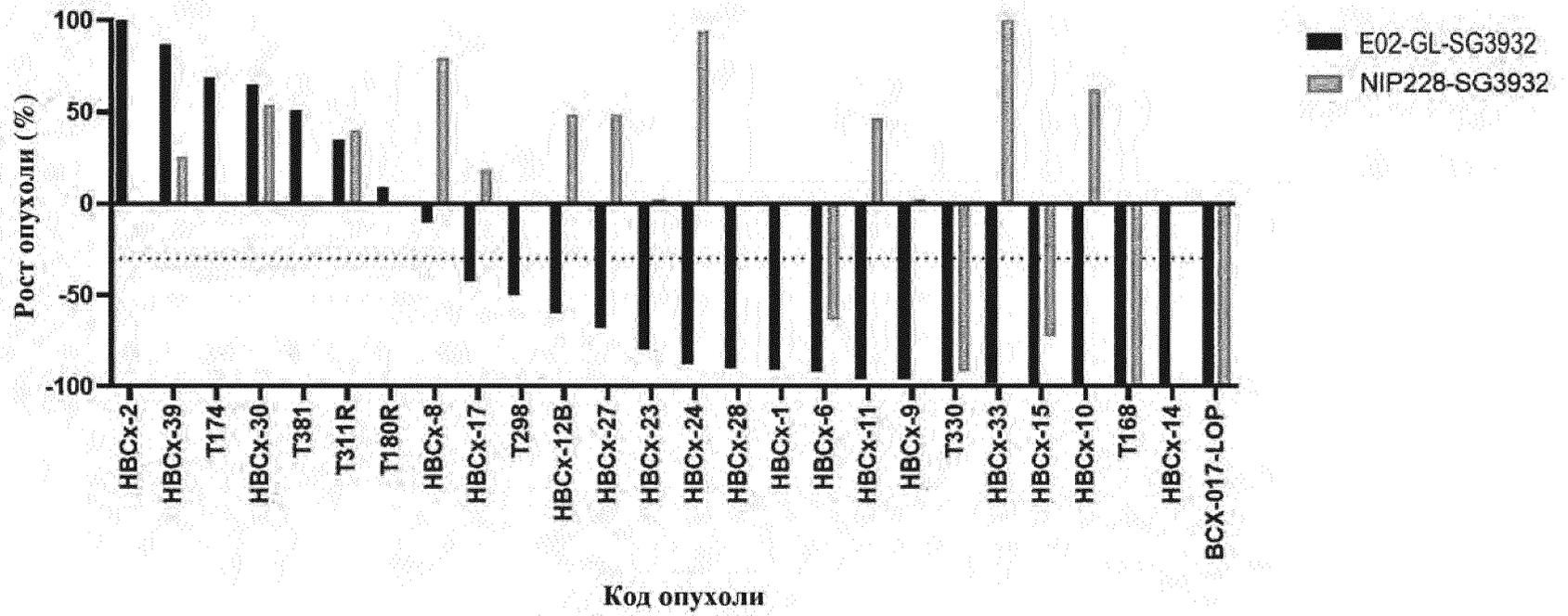
Ответ на 1,25 мг/кг NIP228-SG3932 согласно цифровому Н-баллу  
для патологий



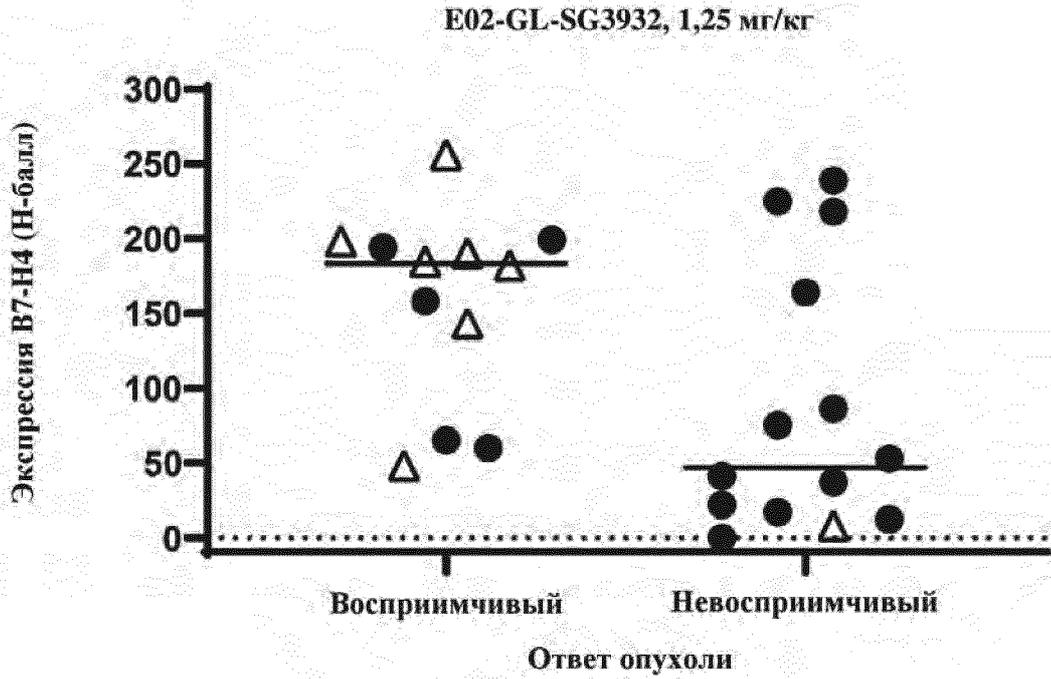
ФИГ. 52А



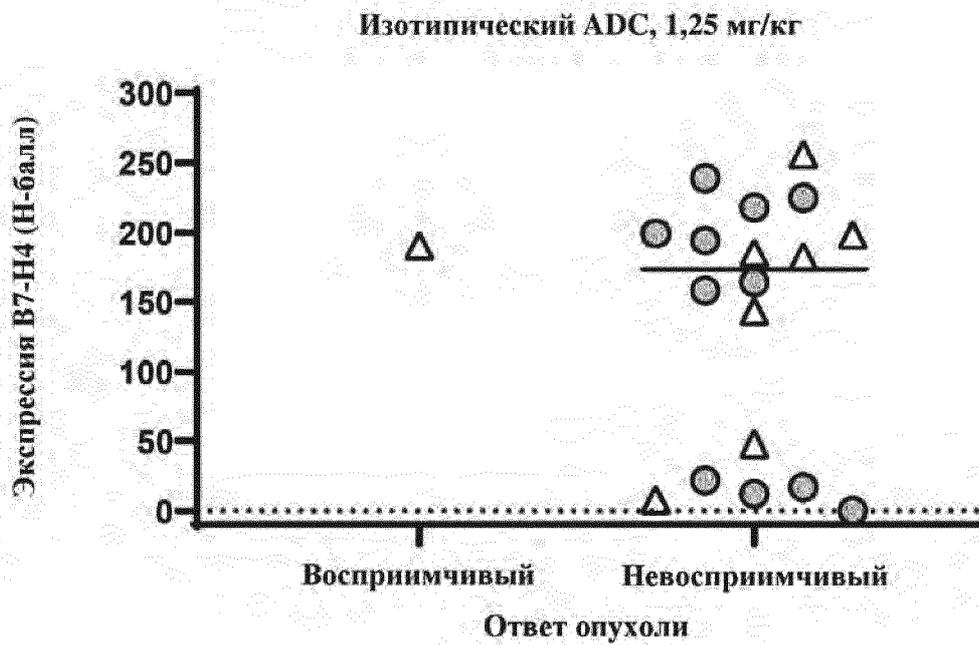
ФИГ. 52В



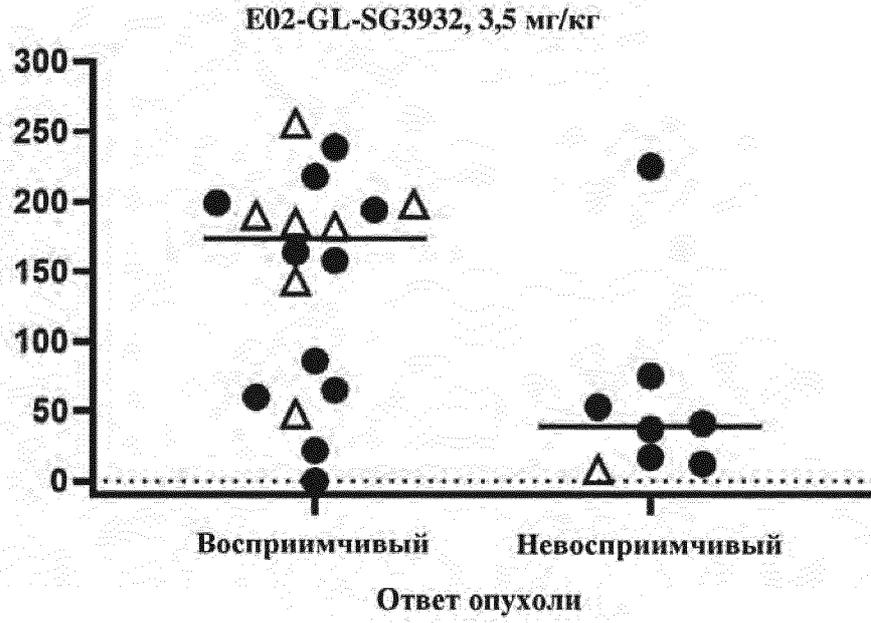
ФИГ. 53А



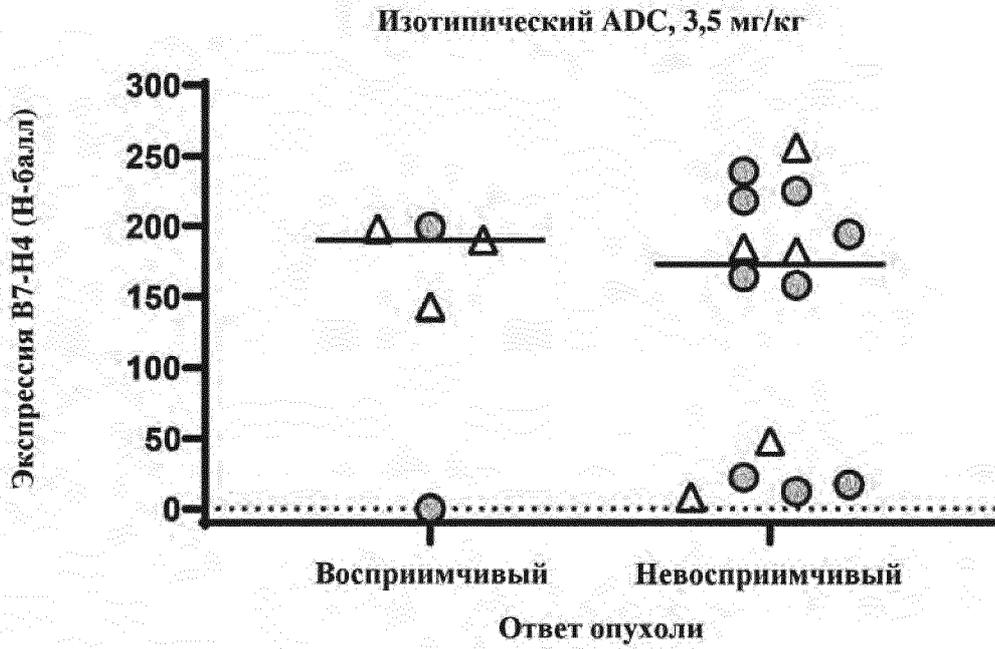
ФИГ. 53В



ФИГ. 53С

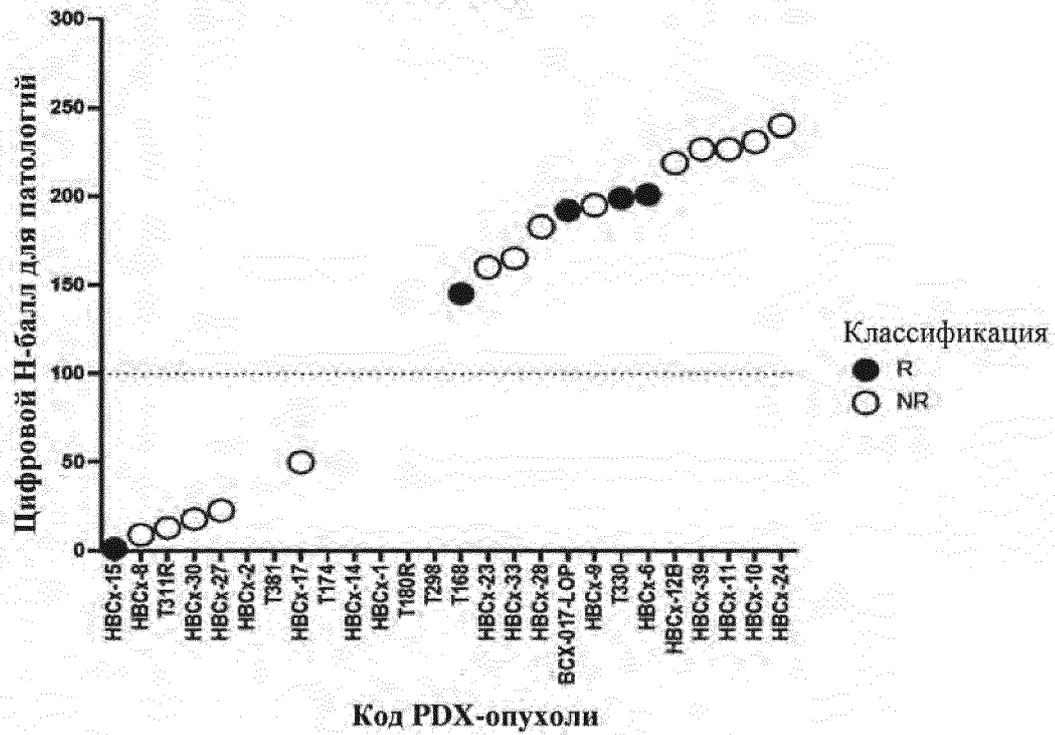


ФИГ. 53D



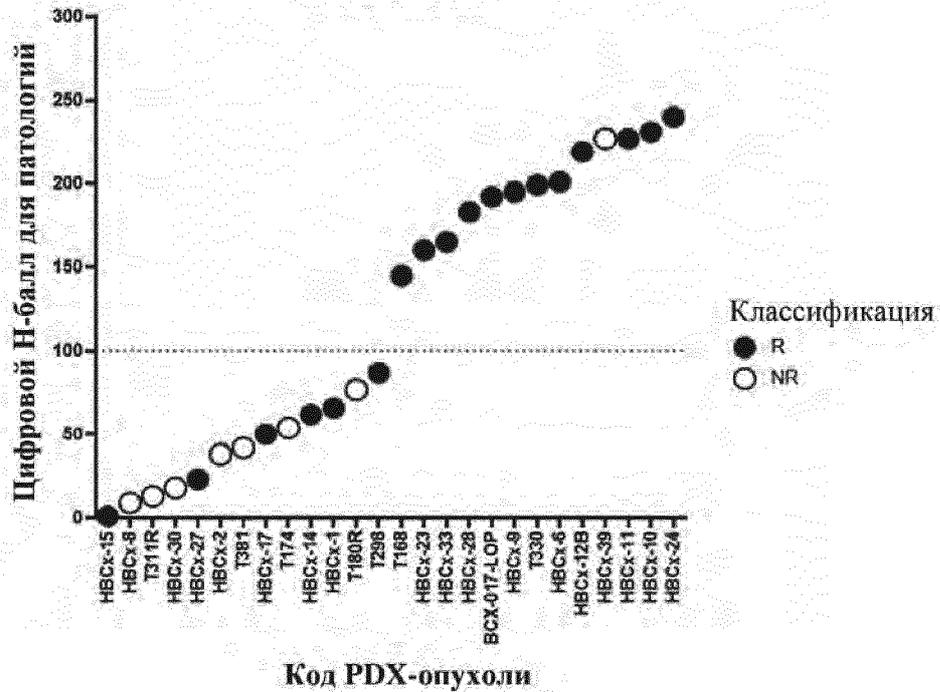
ФИГ. 53E

Ответ на 3,5 мг/кг NIP228-SG3932 согласно Н-баллу для патологий

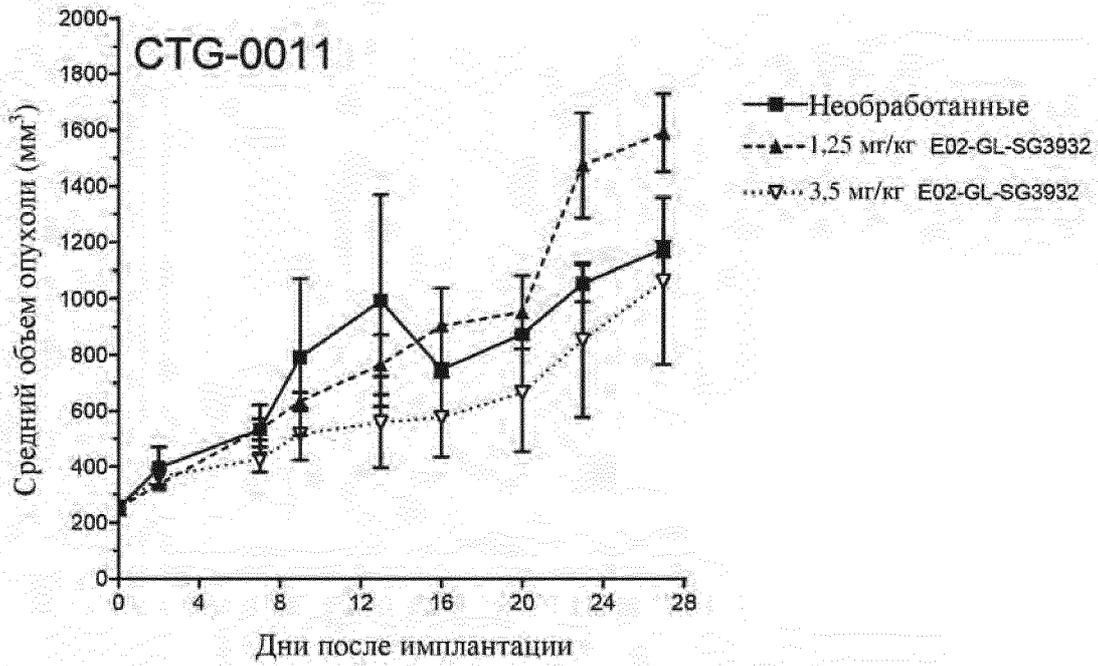


ФИГ. 54А

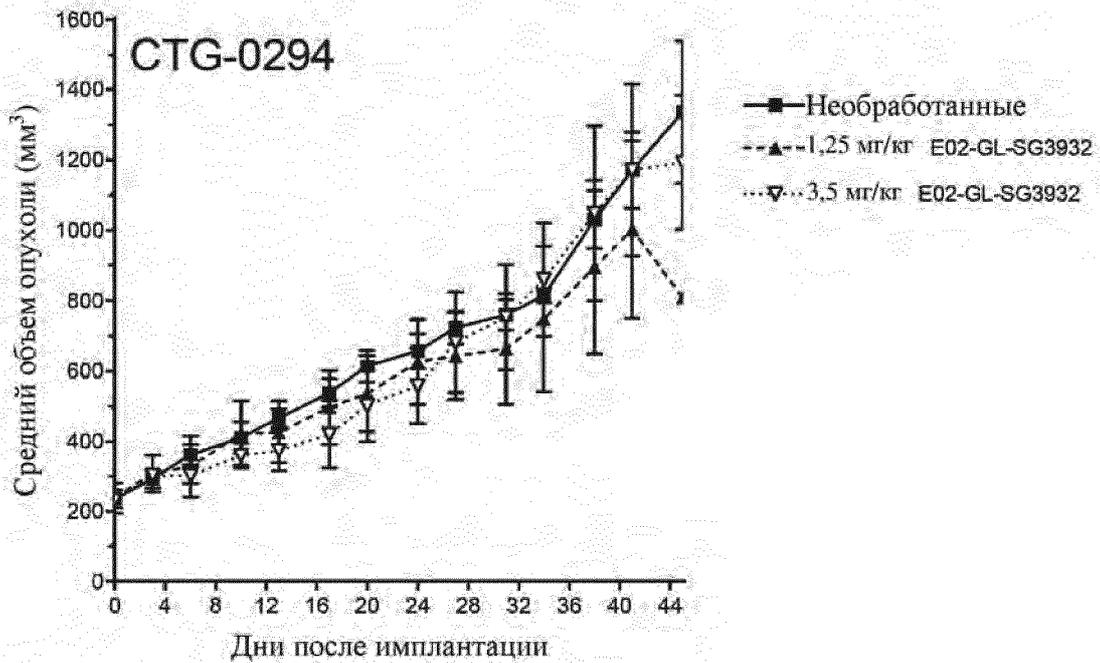
Ответ на 3,5 мг/кг E02-GL-SG3932 согласно Н-баллу для патологий



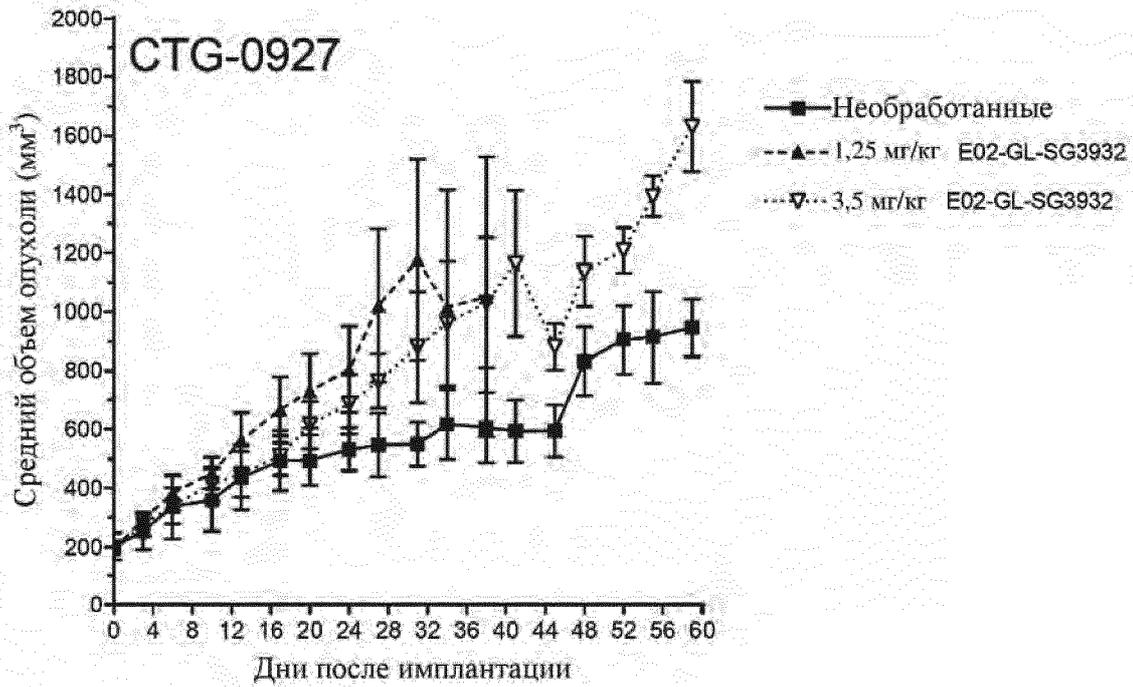
ФИГ. 54В



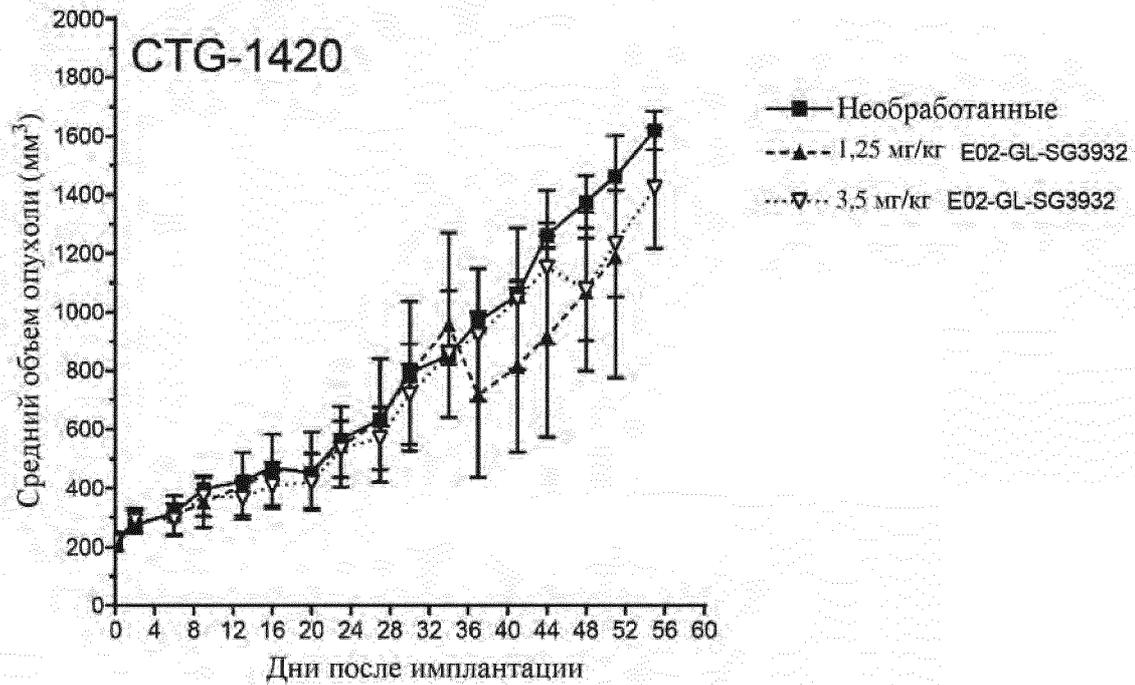
ФИГ. 55А



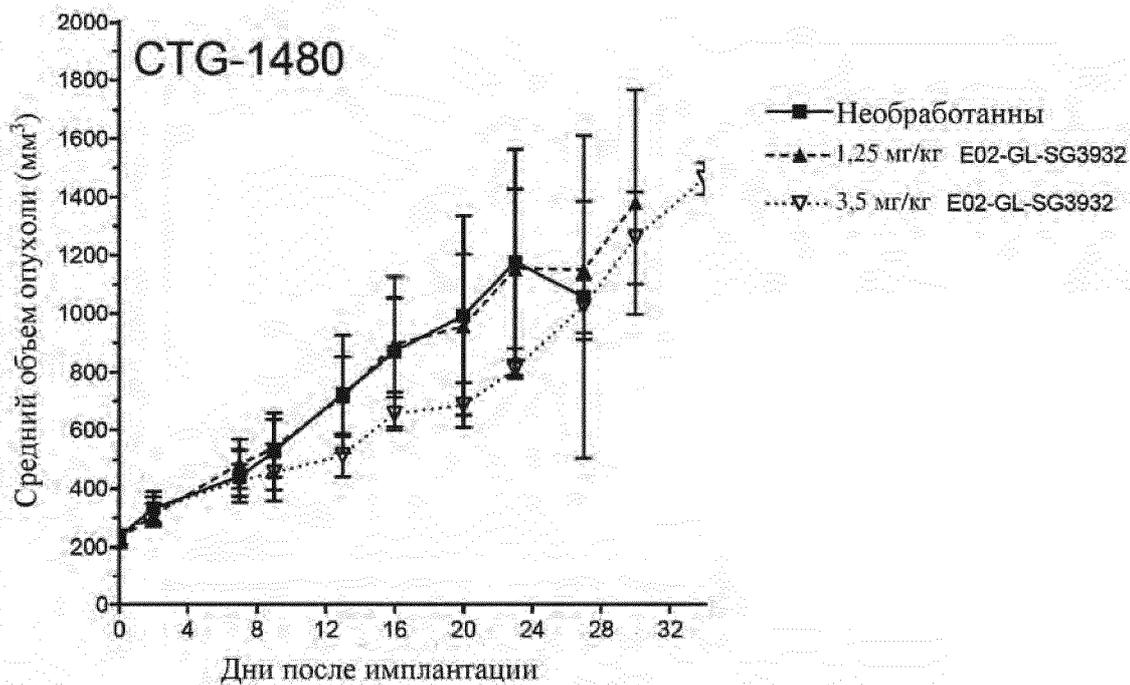
ФИГ. 55В



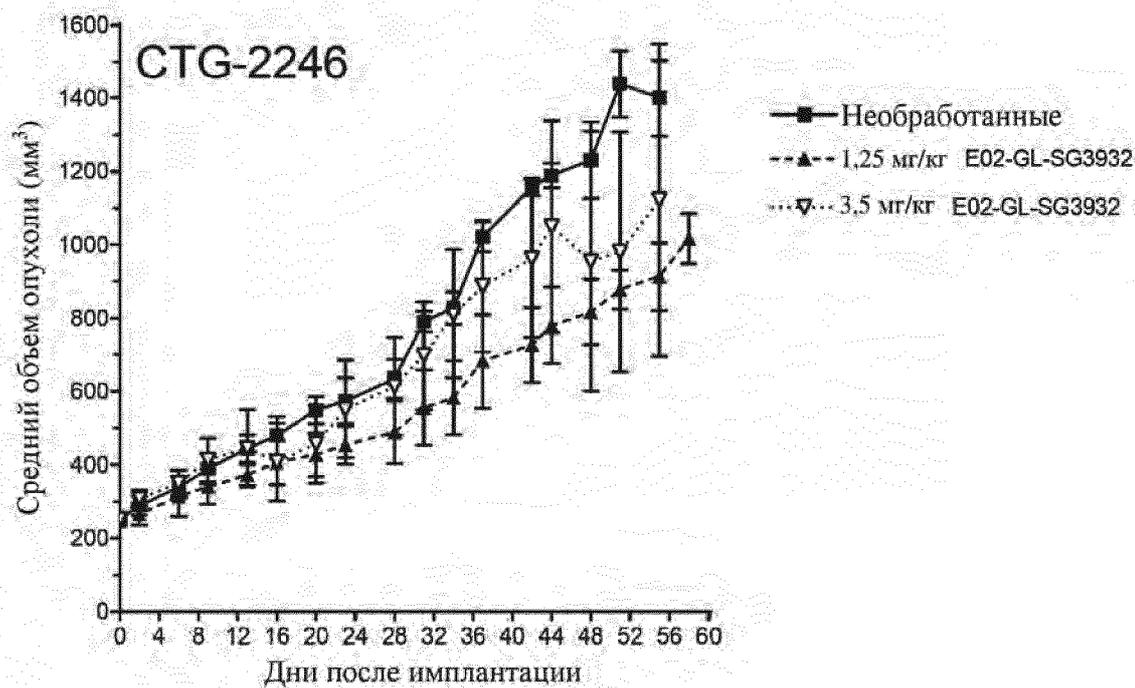
ФИГ. 55С



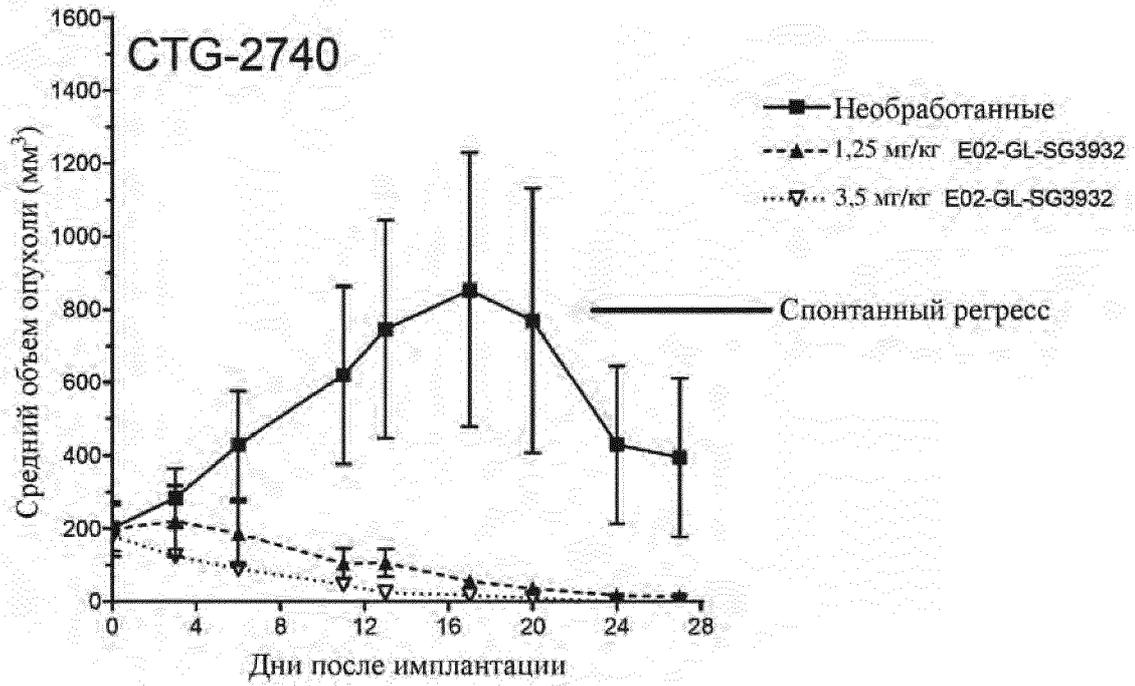
ФИГ. 55D



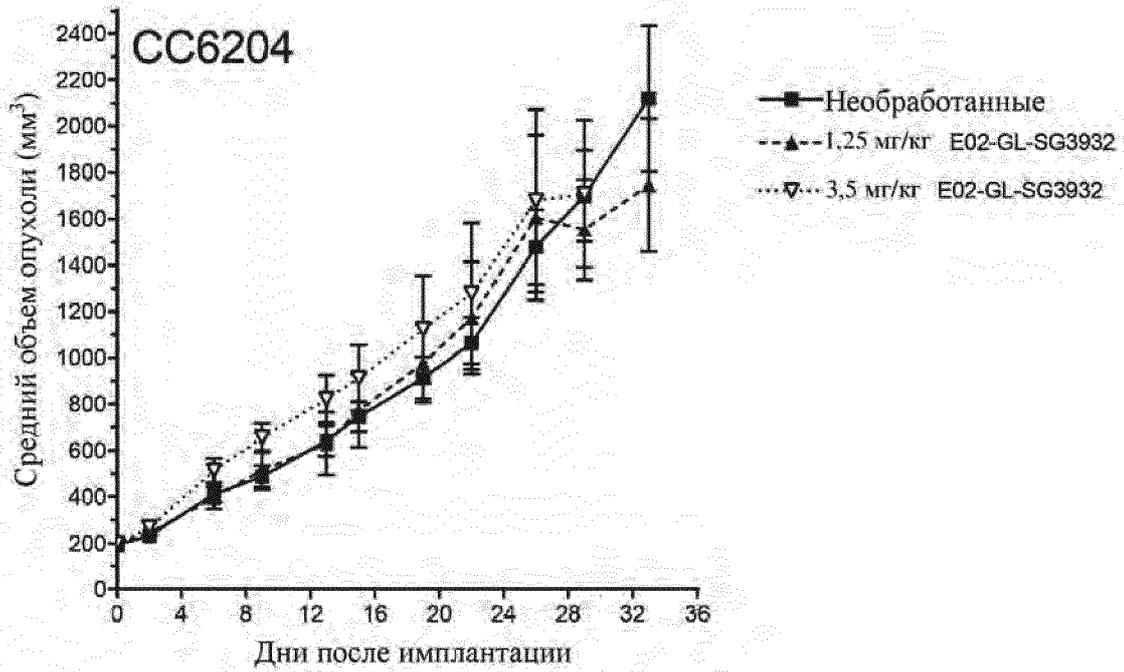
ФИГ. 55E



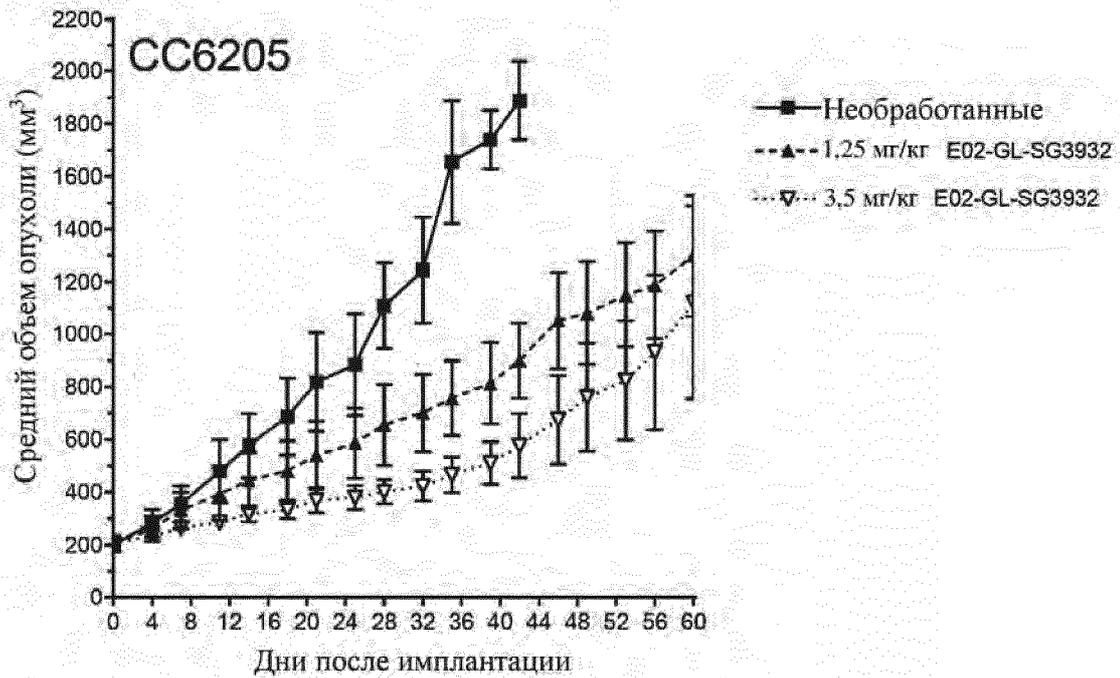
ФИГ. 55F



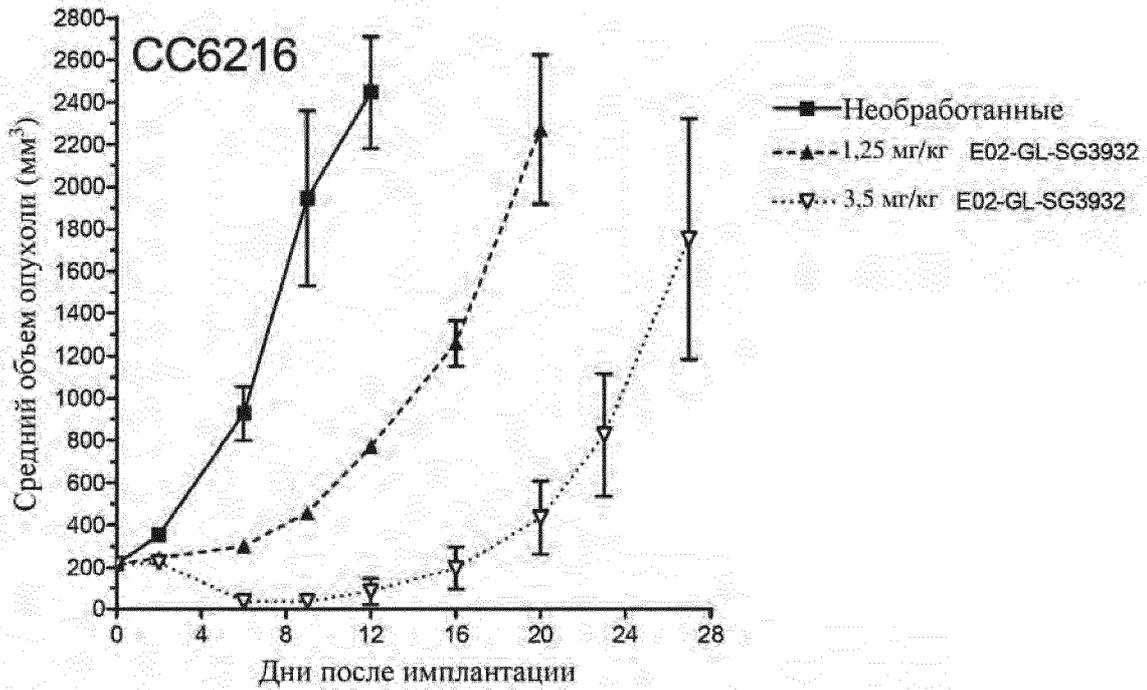
ФИГ. 55G



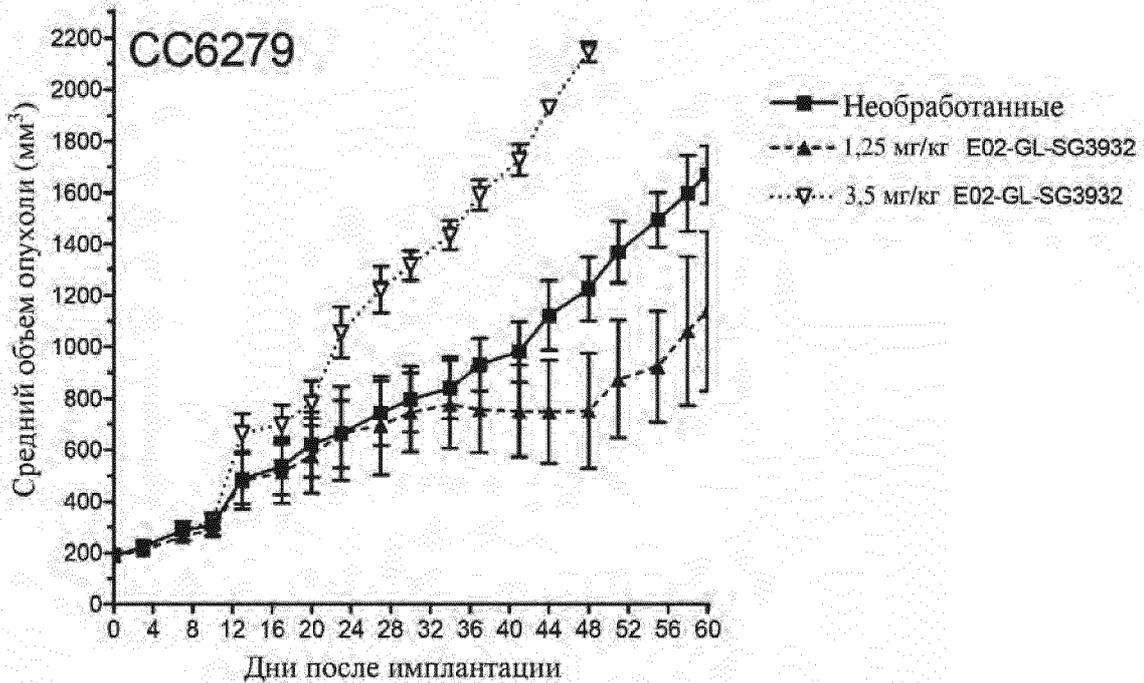
ФИГ. 56А



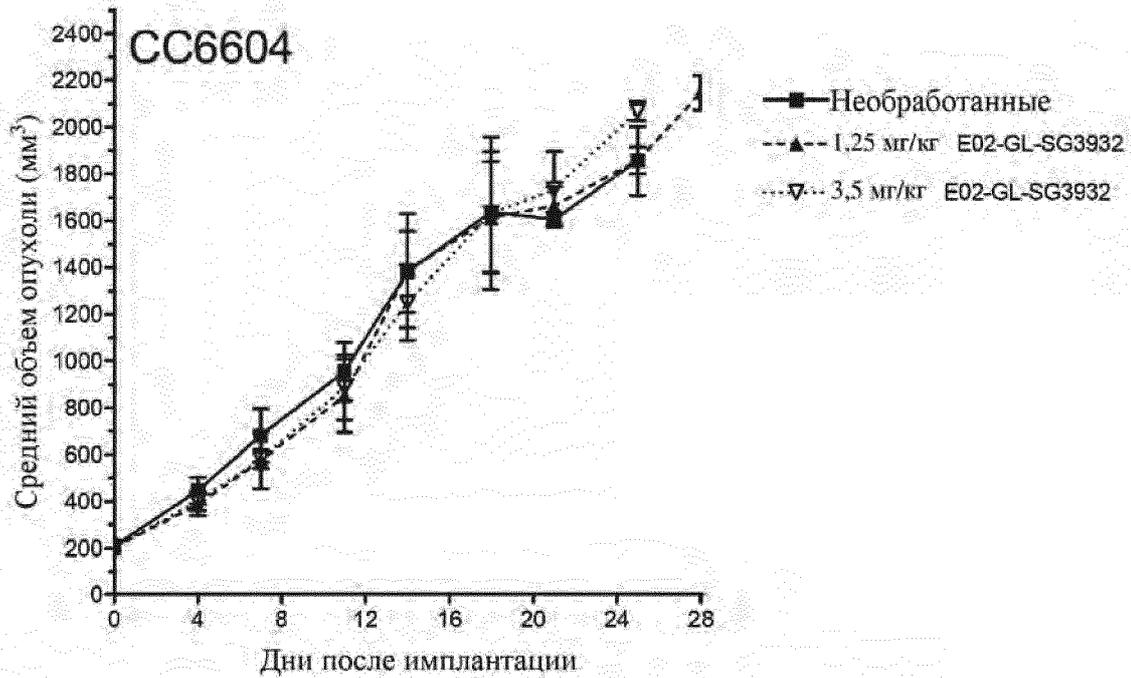
ФИГ. 56В



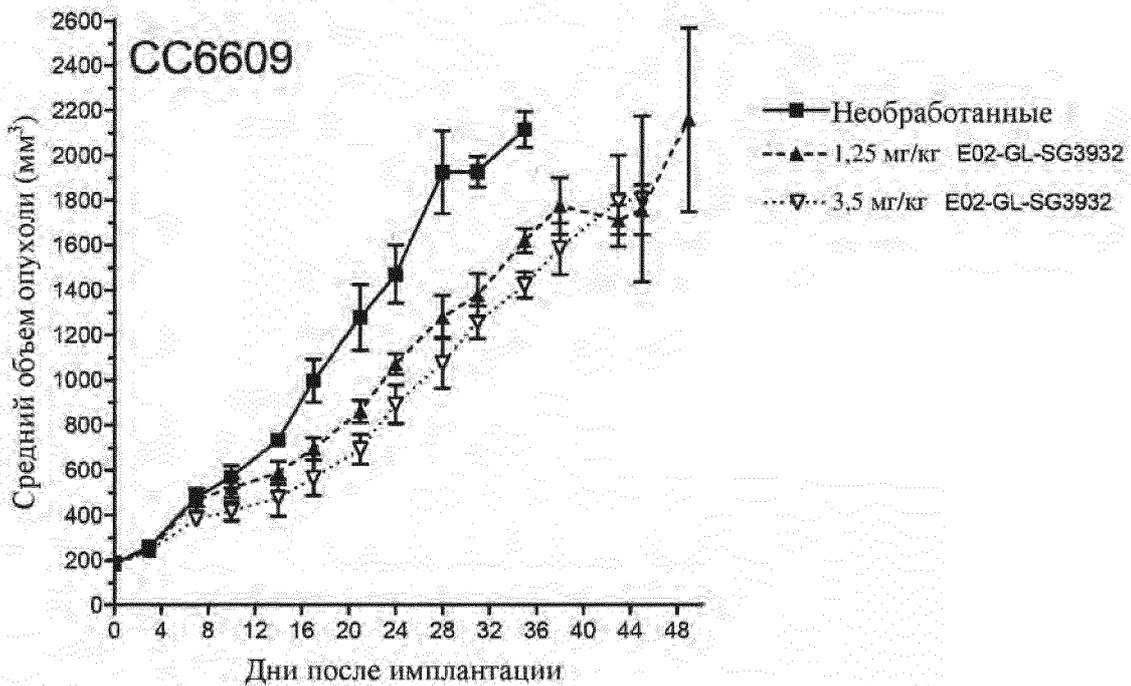
ФИГ. 56С



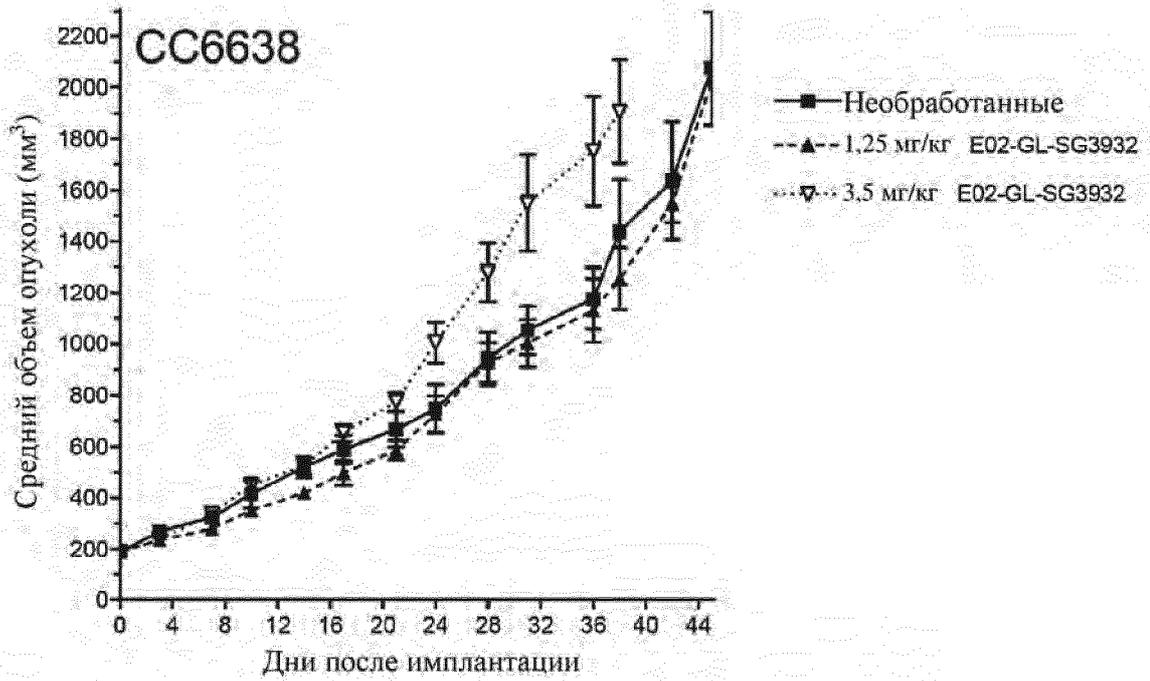
ФИГ. 56D



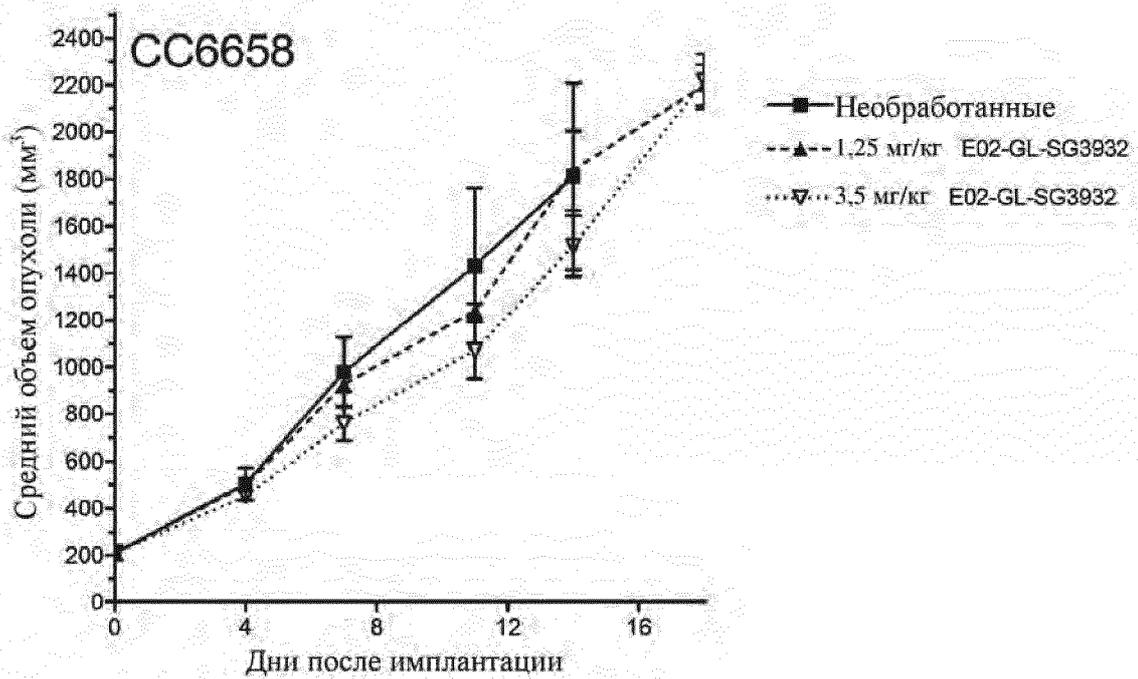
ФИГ. 56Е



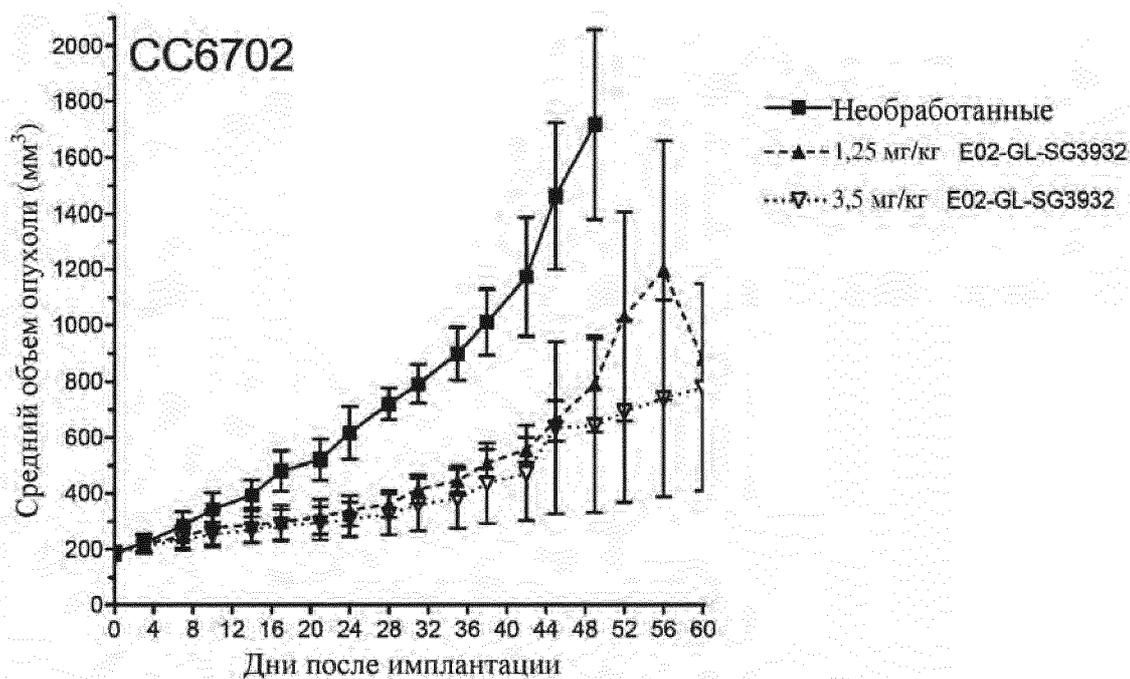
ФИГ. 56F



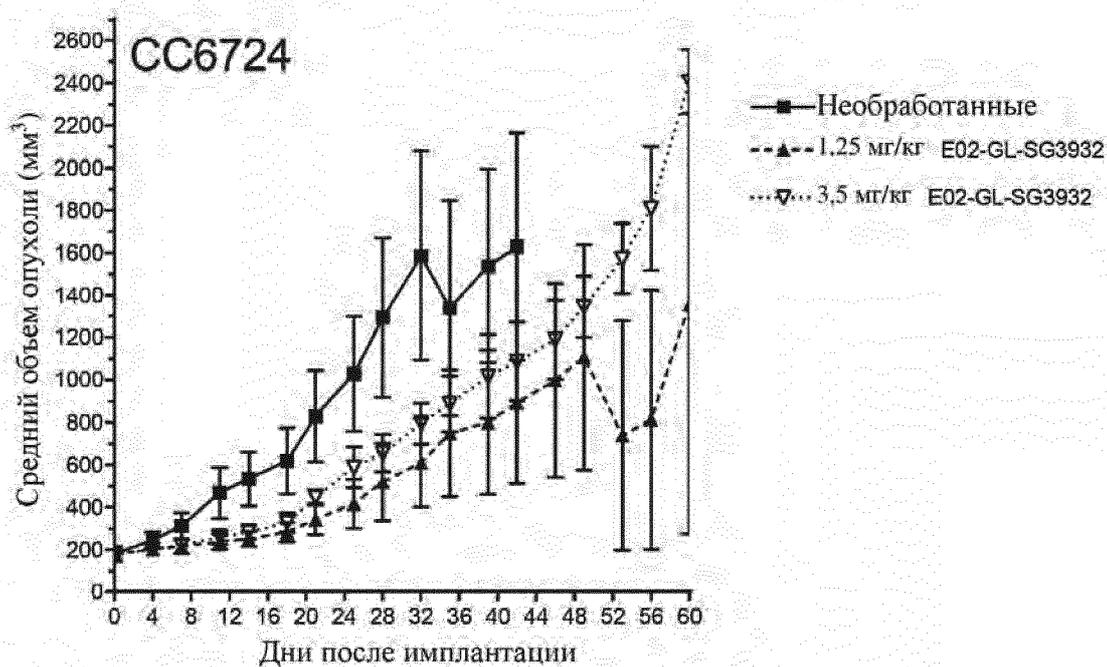
ФИГ. 56G



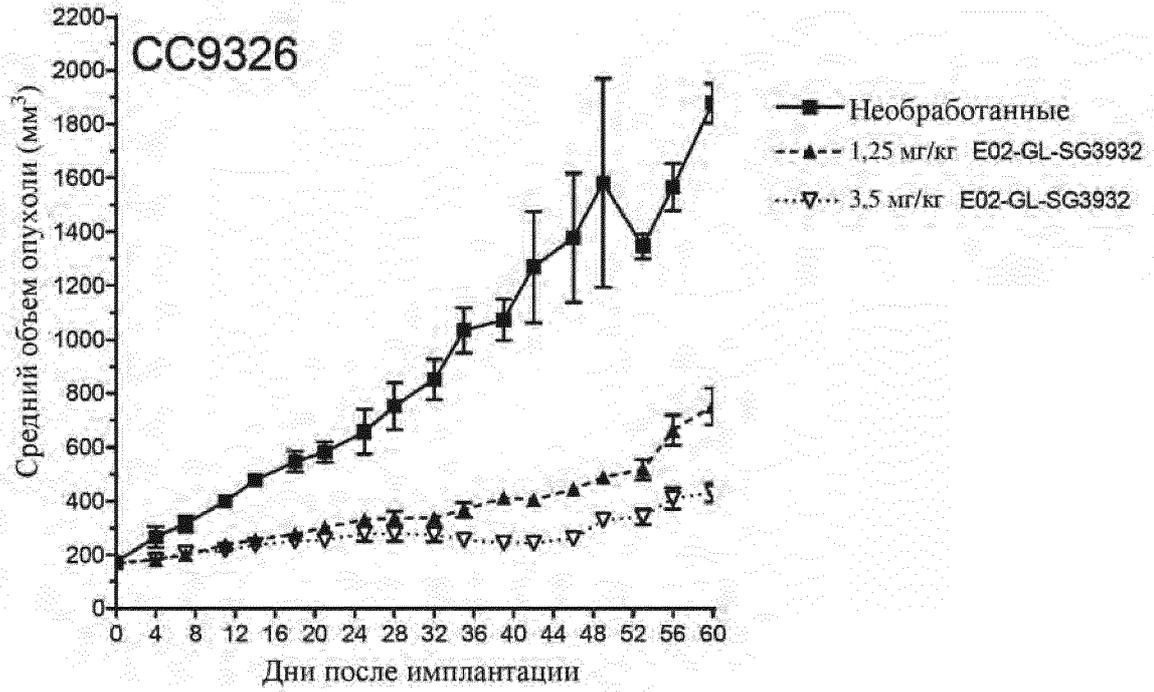
ФИГ. 56H



ФИГ. 56I



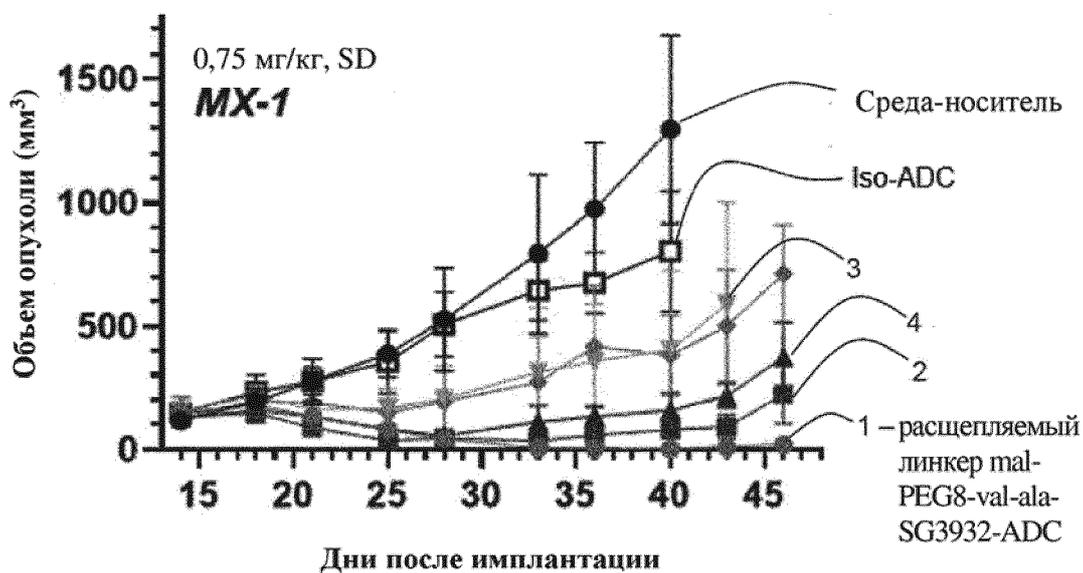
ФИГ. 56J



ФИГ. 56К

	ADC	Линкер-поражающий элемент
1	E02-INT-расщепляемый линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

ФИГ. 57А



ФИГ. 57В

**Цель:** оценка нецелевой токсичности и токсикокинетики у крыс

**План исследования:**



20 мг/кг  
60 мг/кг  
Q3W x2  
внутривенно

Проведение прижизненной оценки:  
функции всех основных органов и систем, РК

Поверхностное микроскопическое исследование  
45+ органов, образцы для метаболомического,  
протеомного анализа

Обобщенные сведения о результатах, наблюдаемых при  
каждом уровне доз

Результаты	1 **	2 SG4010	3 SG4057	4 SG4052
Гемобласт.				
Печень				
Семенники				
ШКТ				
Почка				
Легкое				
Щитовид. жлез., всс				

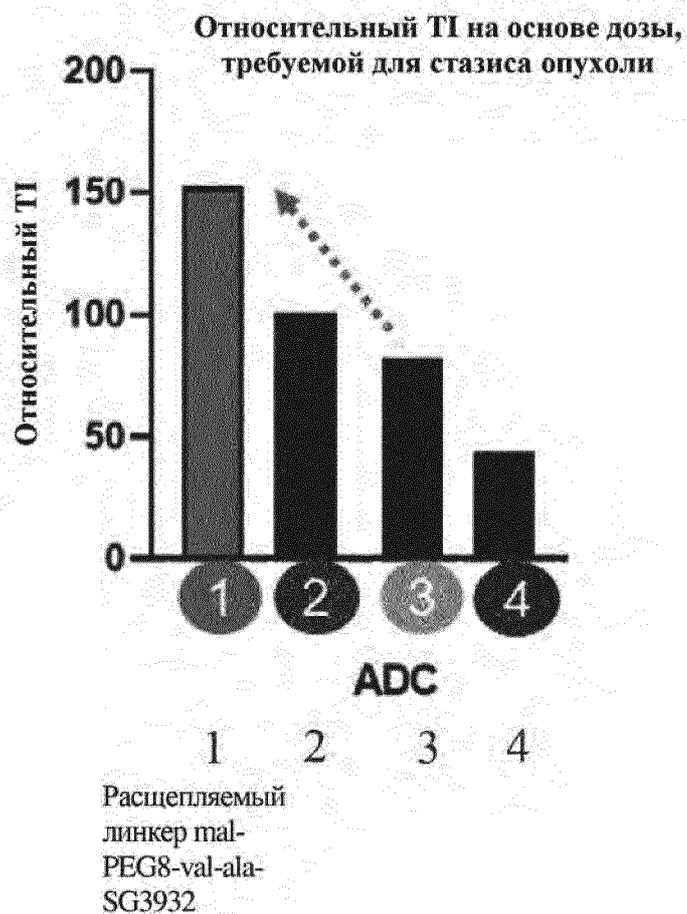
■ Обозначает, что изменения отличались повышенной тяжестью по сравнению с исходным уровнем/контролем

\*\* Расщепляемый линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932

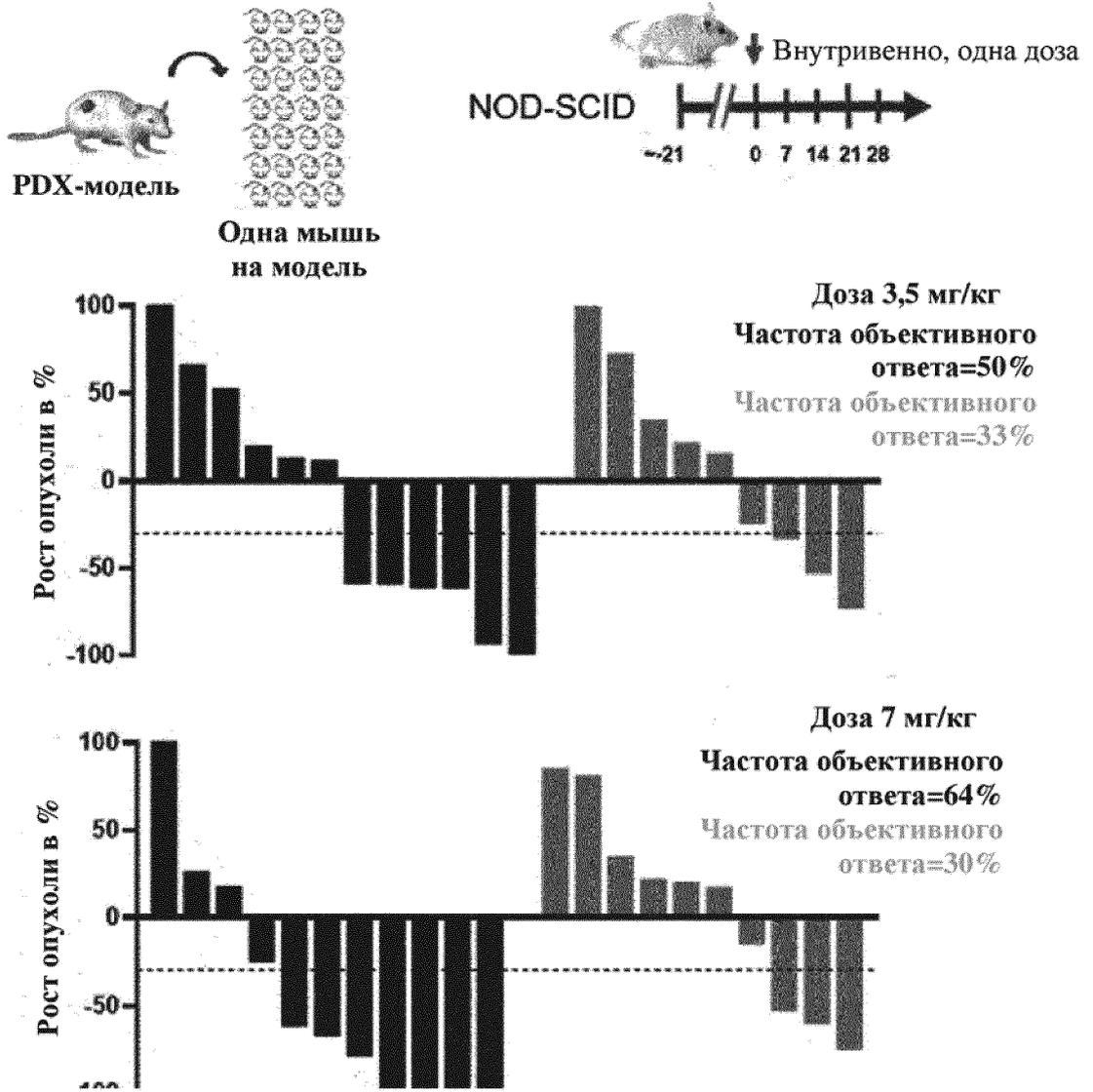
ФИГ. 58

	ADC	Линкер-поражающий элемент
1	E02-INT-расщепляемый линкер mal-PEG8-val-ala-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

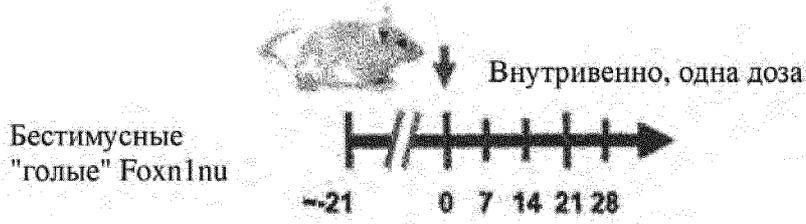
ФИГ. 59А



ФИГ. 59В

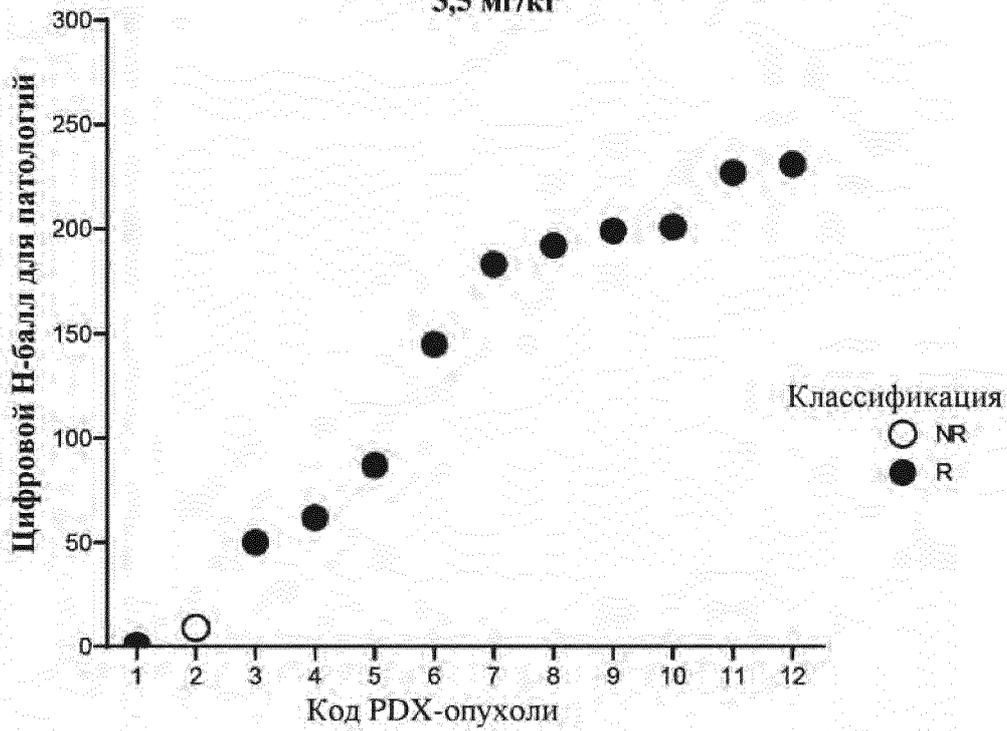


ФИГ. 60А



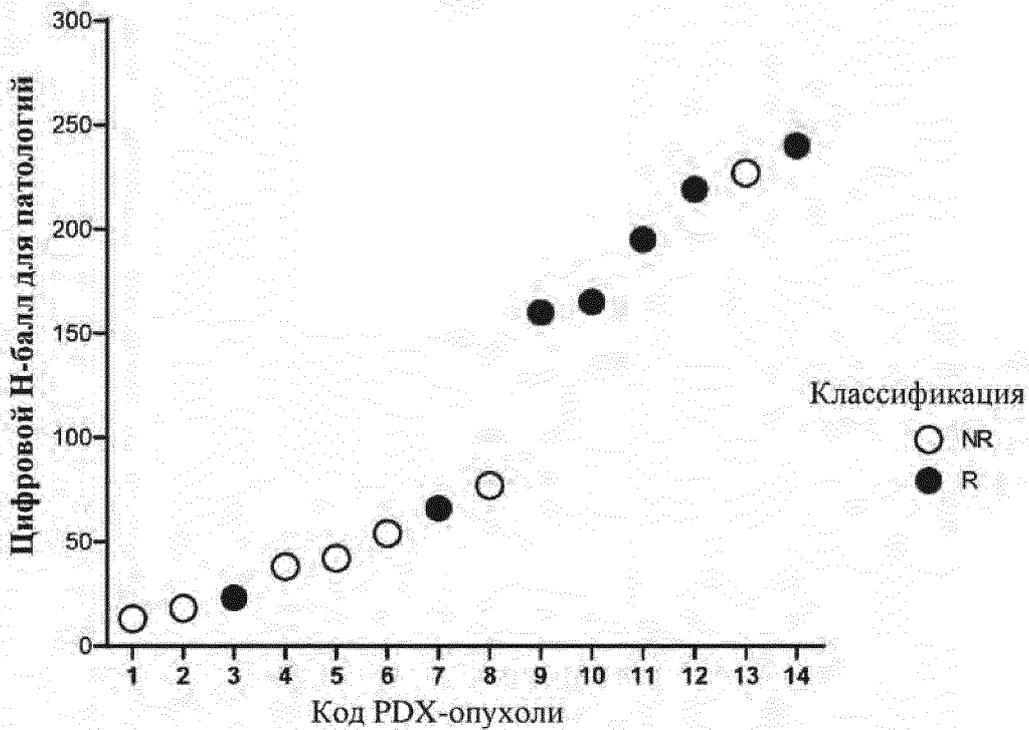


PDX-модели с дефицитом HR: E02-GL-SG3932,  
3,5 мг/кг

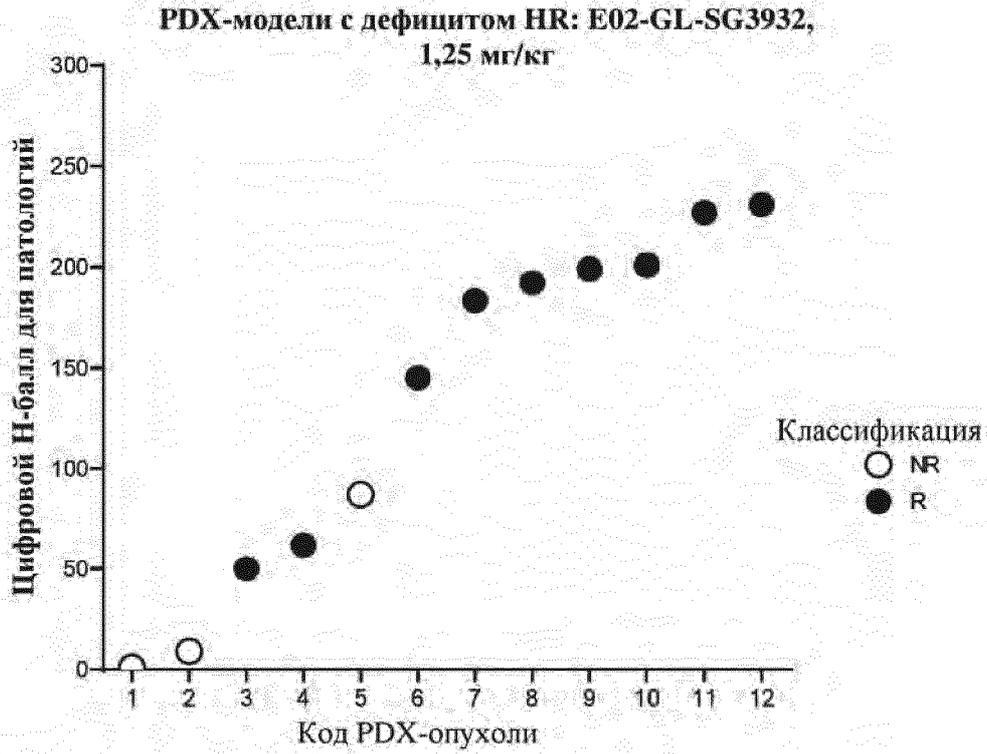


ФИГ. 62А

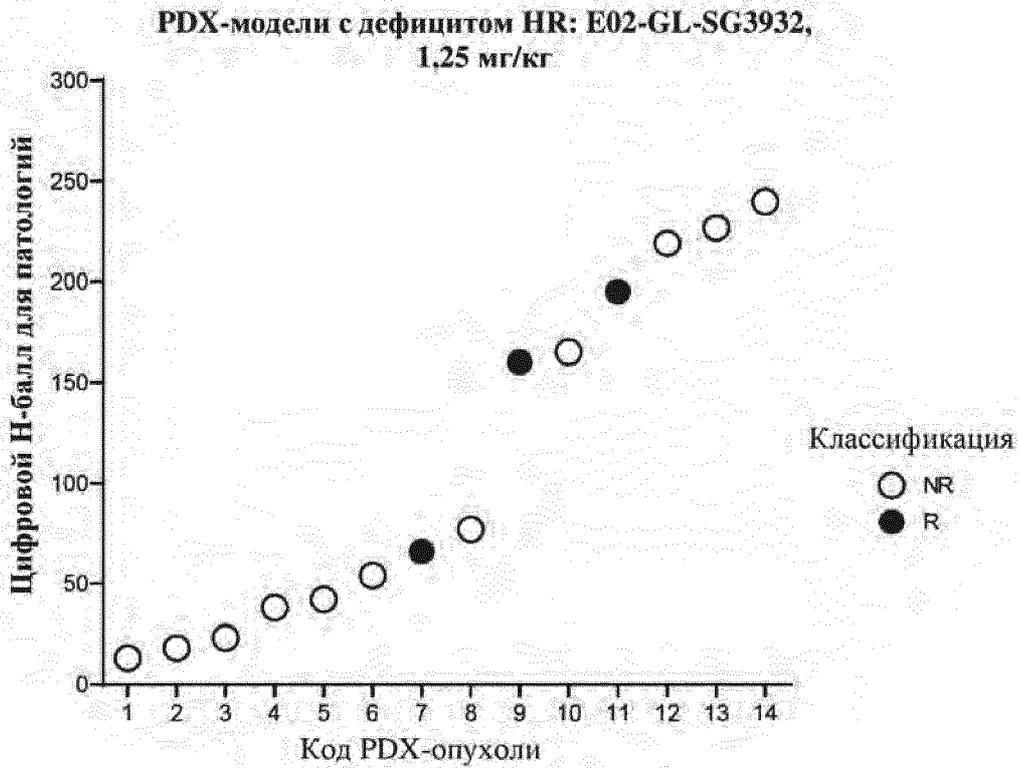
PDX-модели с дефицитом HR: E02-GL-SG3932,  
3,5 мг/кг



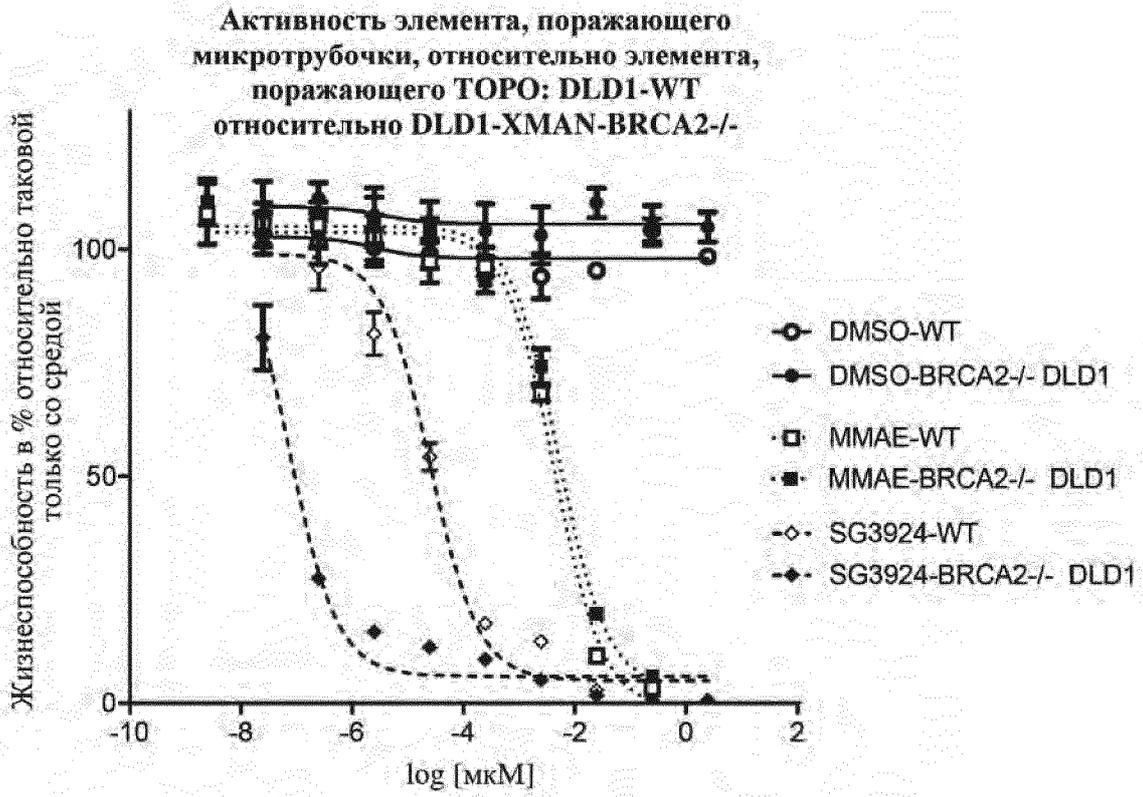
ФИГ. 62В



ФИГ. 62С



ФИГ. 62D



ФИГ. 63