

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202492029 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.11.08(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2023.02.15

(54) СРЕДСТВА КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА К В7-Н4 И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

(31) 63/310,967; 63/378,295

(72) Изобретатель:
Лео Элизабетта (GB), Тосто Фрэнсис
Энн, Киннир Криста Линн, Кук
Кимберли, Чизбро Джон (US)

(32) 2022.02.16; 2022.10.04

(33) US

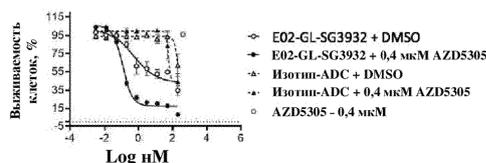
(86) PCT/EP2023/053720

(87) WO 2023/156434 2023.08.24

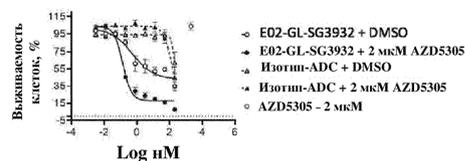
(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предусмотрены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту: i) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), ii) цитотоксического средства и iii) дополнительного средства, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR или их фармацевтически приемлемую соль. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы, содержащие: i) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), ii) цитотоксическое средство и iii) дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR или их фармацевтически приемлемую соль.

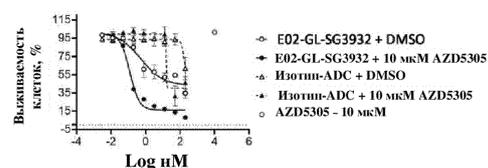
E02-GL-SG3932 + 0,4 мкМ AZD5305



E02-GL-SG3932 + 2 мкМ AZD5305



E02-GL-SG3932 + 10 мкМ AZD5305



A1

202492029

202492029

A1

**СРЕДСТВА КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА,
СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА К В7-Н4 И ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/310967, поданной 16 февраля 2022 года, и предварительной заявки на патент США № 63/378295, поданной 4 октября 2022 года, которые включены в данный документе 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 XML размером 54907 байт под названием "В7Н4-101-WO-PCT_SeqList.xml", созданный 8 февраля 2023 года.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, включающий введение субъекту i) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), ii) цитотоксического средства и iii) дополнительного средства, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR или их фармацевтически приемлемую соль. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы, содержащие i) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), ii) цитотоксическое средство и iii) дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR или их фармацевтически приемлемую соль.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Хирургия, лучевая терапия и химиотерапия, отдельно или в комбинации, являются наиболее традиционными и широко применяемыми способами лечения рака. Хотя эти способы лечения эффективны в удалении или уничтожении раковых клеток, они часто приводят к нежелательным побочным эффектам, таким как выпадение волос, анемия, сильная тошнота и гибель здоровых клеток у пациентов, проходящих лечение. В связи с этими ограничениями возникает острая необходимость в инновационных и менее вредных способах лечения рака.

[0005] Средства терапии рака на основе антител основаны на распознавании и связывании конъюгатов антитело-лекарственное средство с определенными белками на

раковых клетках. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут использовать преимущества специфичности части, представляющей собой антитело, для доставки высокотоксичного средства непосредственно к подлежащим уничтожению клеткам. Применение средств противораковой терапии на основе антитела или ADC в комбинации с другими средствами противораковой терапии на основе малых молекул может обеспечить улучшение исходов путем воздействия на злокачественные клетки и опухоли более чем одним способом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту-человеку

A) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

a) 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;

b) 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;

c) 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;

d) 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

e) 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;

ii. расщепляемый линкер; и

iii. цитотоксическое средство; и

B) дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR или их фармацевтически приемлемую соль. В

некоторых аспектах дополнительное средство представляет собой AZD5305. В некоторых аспектах дополнительное средство представляет собой AZD6738.

[0007] В некоторых аспектах способа рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4. В некоторых аспектах рак дополнительно предусматривает раковую клетку, которая не экспрессирует В7-Н4. В некоторых аспектах рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточного и/или аденокарциномы), рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого. В некоторых аспектах 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). В некоторых аспектах рак представляет собой рак с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD). В некоторых аспектах рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRD, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD выбран из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*.

[0008] В некоторых аспектах способа антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

i. варибельную область тяжелой (VH) цепи и варибельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;

ii. варибельную область тяжелой (VH) цепи и варибельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;

iii. варибельную область тяжелой (VH) цепи и варибельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;

iv. варибельную область тяжелой (VH) цепи и варибельную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;

v. варибельную область тяжелой (VH) цепи и варибельную 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.

[0009] В некоторых аспектах 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.

[0010] В некоторых аспектах 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.

[0011] В некоторых аспектах способа антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают линию клеток OVCAR4.

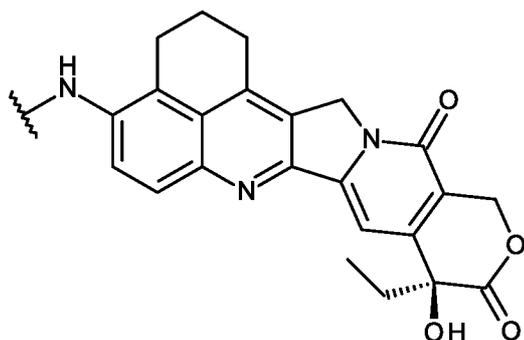
[0012] В некоторых аспектах способа антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42. В некоторых аспектах 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. В некоторых аспектах 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.

[0013] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело. В некоторых аспектах антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизованное моноклональное антитело.

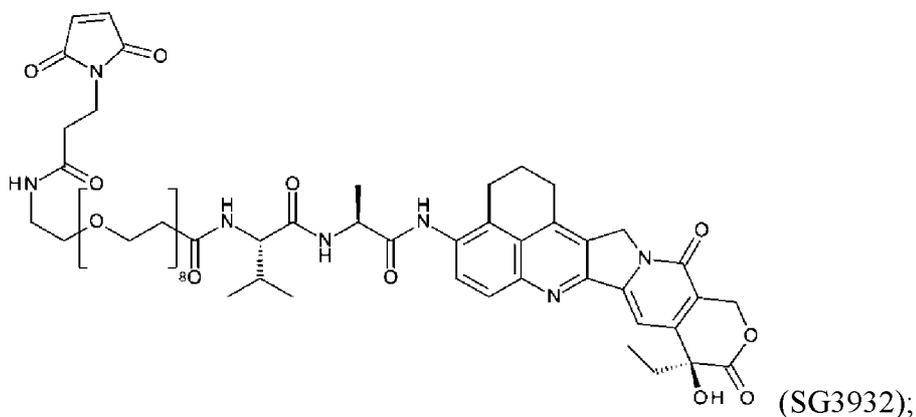
[0014] В некоторых аспектах расщепляемый линкер представляет собой линкер mp-PEG8-val-ala.

[0015] В некоторых аспектах цитотоксическое средство представляет собой ингибитор топоизомеразы. В некоторых аспектах ингибитор топоизомеразы представляет собой соединение формулы A*:

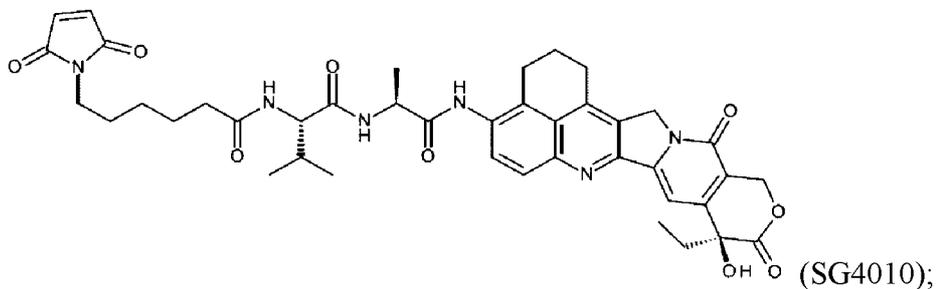


A*

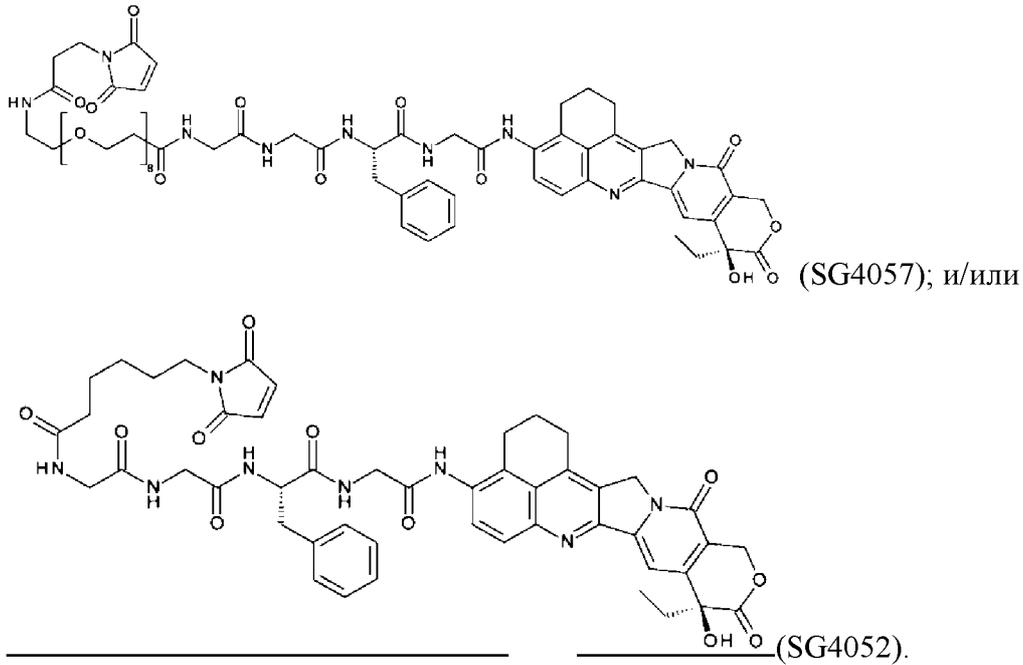
[0016] В некоторых аспектах способа ii) линкер и iii) цитотоксическое средство вместе выбраны из следующих соединений:



(SG3932);



(SG4010);



[0017] В некоторых аспектах способа ii) линкер и iii) цитотоксическое средство вместе представляют собой соединение SG3932.

[0018] В некоторых аспектах способа ADC характеризуется соотношением лекарственного средства и антитела (DAR), составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 8. В некоторых аспектах ADC характеризуется DAR, составляющим приблизительно 8.

[0019] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к набору, содержащему

A) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

a) 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;

b) 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;

c) 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;

d) 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

e) 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;

ii. расщепляемый линкер; и

iii. цитотоксическое средство; и

B) дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых аспектах дополнительное средство представляет собой AZD5305. В некоторых аспектах дополнительное средство представляет собой AZD6738.

[0020] В некоторых аспектах набора 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.

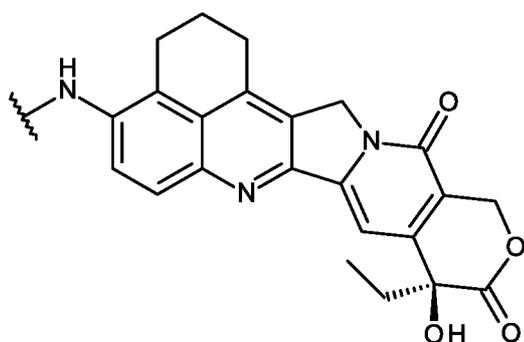
[0021] В некоторых аспектах набора антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

i. VH-цепь и VL-цепь, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант.

[0022] В некоторых аспектах набора антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42. В некоторых аспектах 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. В некоторых аспектах 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.

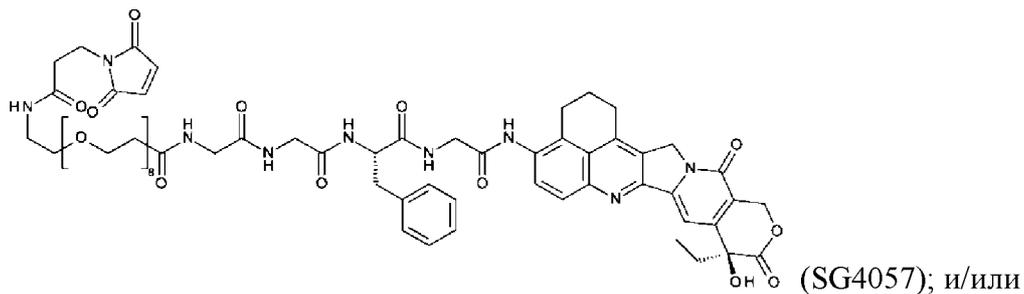
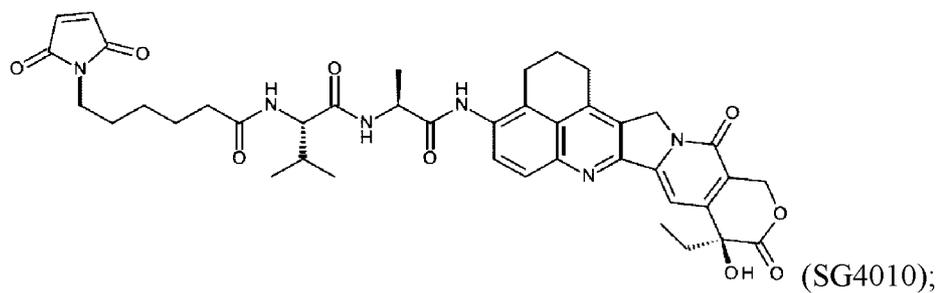
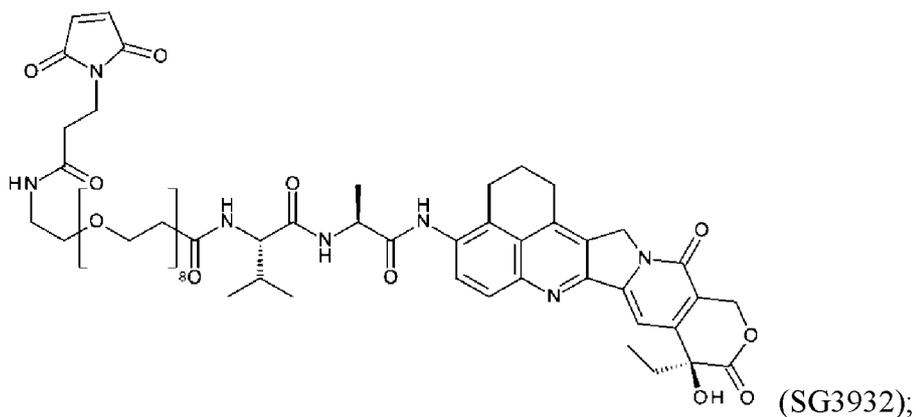
[0023] В некоторых аспектах набора расщепляемый линкер представляет собой линкер mp-PEG8-val-ala.

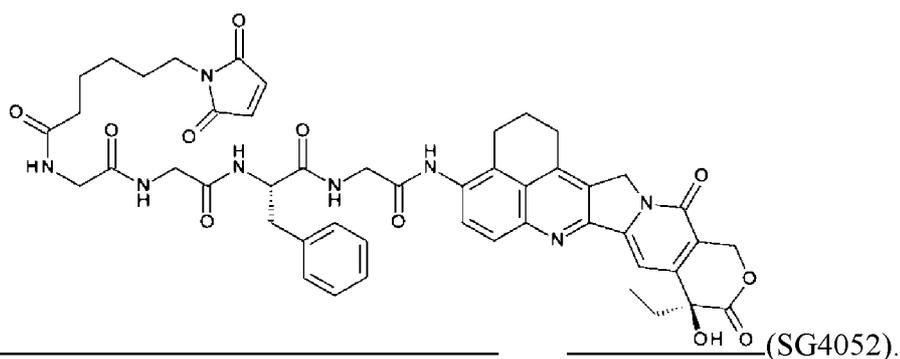
[0024] В некоторых аспектах набора цитотоксическое средство представляет собой ингибитор топоизомеразы. В некоторых аспектах ингибитор топоизомеразы представляет собой соединение формулы A*:



A*

[0025] В некоторых аспектах набора ii) линкер и iii) цитотоксическое средство вместе выбраны из следующих соединений:





[0026] В некоторых аспектах набора ii) линкер и iii) цитотоксическое средство вместе представляют собой соединение SG3932.

[0027] В некоторых аспектах набора ADC характеризуется соотношением лекарственного средства и антитела (DAR), составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 8. В некоторых аспектах ADC характеризуется DAR, составляющим приблизительно 8.

[0028] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту-человеку

A) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

a) 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;

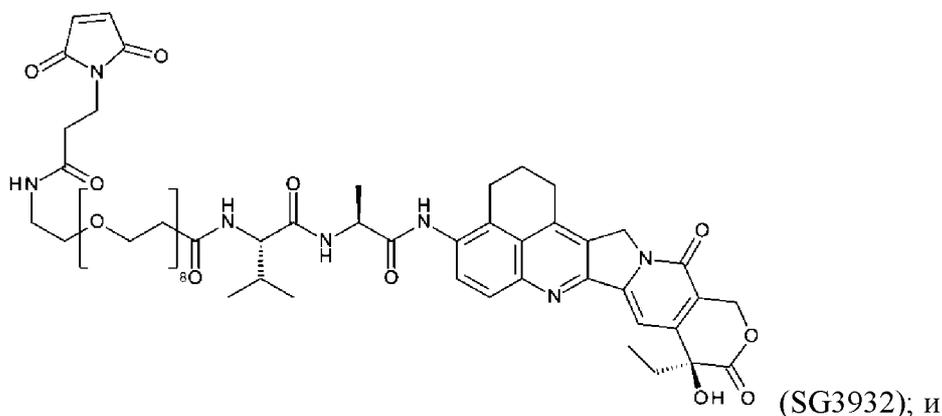
b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;

c) 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;

d) 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

е) 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; и

ii. расщепляемый линкер и цитотоксическое средство, конъюгированные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, характеризующиеся формулой:



В) AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0029] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту-человеку

А) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие:

f) 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;

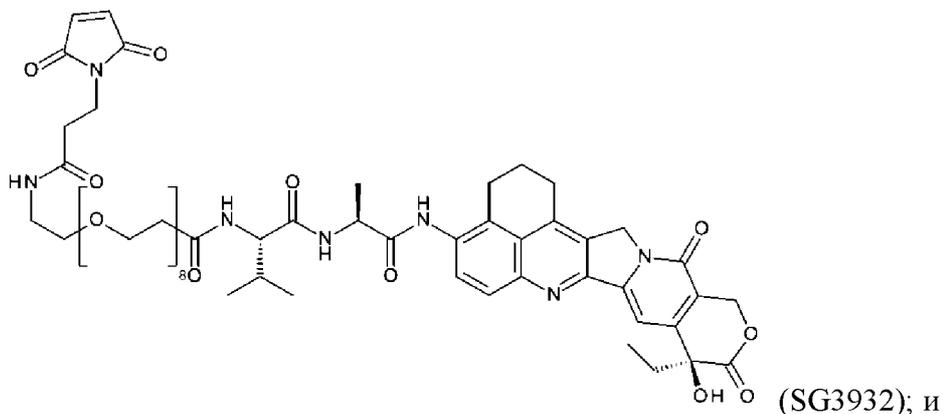
g) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;

h) 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;

i) 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

j) 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; и

ii. расщепляемый линкер и цитотоксическое средство, конъюгированные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, характеризующиеся формулой:



В) AZD6738 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0030] В некоторых аспектах способа рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4. В некоторых аспектах рак дополнительно предусматривает раковую клетку, которая не экспрессирует В7-Н4. В некоторых аспектах рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточного и/или аденокарциномы), рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого. В некоторых аспектах 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). В некоторых аспектах рак представляет собой рак с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD). В некоторых аспектах рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRD, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD выбран из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0031] Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации иллюстративных аспектов определенных некоторых аспектов настоящего изобретения.

[0032] На **фигуре 1** представлены результаты анализа цитотоксической активности с применением обработок с помощью E02-GL-SG3932 и AZD5305 клеток DLD-1-BRCA дикого типа, сконструированных для экспрессии B7-H4.

[0033] На **фигуре 2** представлена матрица синергии для баллов по Блиссу для клеток DLD-1-BRCA дикого типа, обработанных с помощью средства комбинированной терапии на основе E02-GL-SG3932 и AZD5305.

[0034] На **фигуре 3** представлены результаты анализа цитотоксической активности с применением обработок с помощью E02-GL-SG3932 и AZD5305 клеток DLD-1-XMAN-BRCA2-/-, сконструированных для экспрессии B7-H4.

[0035] На **фигуре 4** представлена матрица синергии для баллов по Блиссу для клеток DLD-1-XMAN-BRCA2-/-, обработанных с помощью средства комбинированной терапии на основе E02-GL-SG3932 и AZD5305.

[0036] На **фигуре 5** представлены результаты анализа цитотоксической активности с применением обработок с помощью E02-GL-SG3932 и AZD5305 клеток MX-1.

[0037] На **фигуре 6** представлена матрица синергии для баллов по Блиссу для клеток MX-1, обработанных с помощью средства комбинированной терапии на основе E02-GL-SG3932 и AZD5305.

[0038] На **фигуре 7** показана противоопухолевая эффективность *in vivo* отдельных обработок с помощью E02-GL-SG3932 и AZD5305 в мышинной модели.

[0039] На **фигуре 8** представлены результаты экспериментов *in vivo* по противоопухолевой эффективности средств комбинированной терапии на основе E02-GL-SG3932 и AZD5305 на мышинной модели.

[0040] На **фигуре 9** показаны средние значения объема опухолей в экспериментах *in vivo* по противоопухолевой эффективности средств индивидуальной и комбинированной терапии на основе E02-GL-SG3932 и AZD5305 на мышинной модели.

[0041] На **фигуре 10** показаны средние значения объема опухолей в экспериментах *in vivo* по противоопухолевой эффективности средств индивидуальной и комбинированной терапии на основе E02-GL-SG3932 и AZD6738 на мышинной модели.

[0042] На **фигурах 11А - 11С** представлены результаты касательно уровня экспрессии B7-H4 в опухолях человека, как описано в примере 6. **Фигура 11А.** ИНС применяли для оценки уровня экспрессии B7-H4 в различных типах опухолей. Распространенность экспрессии B7-H4 при показании показана долей клеток, экспрессирующих B7-H4 с любой интенсивностью. **Фигура 11В.** Репрезентативные изображения ИНС окрашивания B7-H4 при раке эндометрия, холангиокарциноме, ER+ раке молочной железы или TNBC и раке яичника. **Фигура 11С.** Количественный анализ

изображений, показывающий распределение средней оптической плотности (OD) экспрессии В7-Н4 в каждой мембране опухолевых клеток при хирургической резекции первичной опухоли, фиксированных в формалине, залитых парафином (FFPE) образцов TNBC (n = 196). Каждая усеченный скрипичный график представляет отдельный образец донора. Линии представляют собой медианы.

[0043] На **фигурах 12А - 12F** представлены результаты противоопухолевой эффективности E02-GL-SG3932 в комбинации с PARP1-селективным ингибитором AZD5305 в PDX-моделях TNBC, как описано в примере 6. Опухоли получали, как описано в примере 6, и средства лечения вводили в дозах, указанных на каждой панели. ADC доставляли в виде одной болюсной IV инъекции, а AZD5305 доставляли желудочным зондом один раз в сутки в течение 28 дней. **Фигуры 12А - 12В.** Противоопухолевая эффективность обработки (А) 1,25 мг/кг или (В) 3,5 мг/кг ADC отдельно или в комбинации с AZD5305 в модели НВСх-39 с BRCA WT, экспрессирующие В7-Н4 на высоком уровне. **Фигуры 12С - 12D.** Активность, полученная в результате обработки (С) экспрессирующей В7-Н4 на высоком уровне BRCA1-мутантной модели НВСх-24 и (D) модели НВСх-11, гипоморфной по BRCA1. **Фигуры 12Е - 12F.** Эффективность, полученная в результате обработки (Е) BRCA1-мутантной модели НВСх-8 и (F) модели НВСх-2 с BRCA WT с низким уровнем экспрессии В7-Н4. Данные указывают на средний объем опухоли \pm стандартная ошибка среднего (n = 4 или 5 животных на группу).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0044] В данном документе раскрыты способы, комбинации и наборы, предусматривающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) вместе со вторым средством, таким как низкомолекулярное лекарственное средство. Комбинации способов и наборы могут быть применены для лечения рака у субъекта, как описано в данном документе.

[0045] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку А) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер и iii. цитотоксическое средство; и В) ингибитор PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1). В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку А) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые

связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер и iii. цитотоксическое средство; и В) ингибитора АTR (FRAP-связанного белка 1; FRP1; MEC1; SCKL; SECKL1R).

[0046] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку А) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку А) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) AZD6738 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0047] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку А) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие а) 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; б) 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; в) 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; г) 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 е) 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; ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0048] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку А) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие а) 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; б) 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; в) 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; г) 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 е) 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; ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) AZD6738 или его фармацевтически приемлемую соль.

Лечение видов рака

[0049] В некоторых аспектах в данном документе раскрыт способ лечения рака, который ассоциирован с экспрессией В7-Н4. В некоторых аспектах рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4. В некоторых аспектах рак представляет собой опухоль или другую массу злокачественных клеток, включающую раковую клетку, экспрессирующую В7-Н4. В некоторых аспектах рак дополнительно предусматривает раковую клетку, которая не экспрессирует В7-Н4.

[0050] 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). Было замечено, что В7-Н4 характеризуется высоким

уровнем экспрессии на клетках различных типов рака и считается ассоциированным с опухолью антигеном. Кроме того, экспрессия В7-Н4 не ограничивается конкретным типом рака, благодаря чему он представляет собой целевой антиген для лечения широкого спектра типов рака.

[0051] В предпочтительном аспекте рак, упомянутый в данном документе, представляет собой рак, характеризующийся экспрессией (предпочтительно сверхэкспрессией) молекулы В7-Н4. Другими словами, рак, на который ссылаются в данном документе, может предусматривать раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4. Указанная раковая клетка может содержаться в опухоли. В другом аспекте молекула В7-Н4 экспрессируется в раковой клетке на уровне, аналогичном уровню экспрессии в клетке, отличной от раковой. В другом аспекте молекула В7-Н4 экспрессируется в раковой клетке на более низком уровне, чем уровень экспрессии в клетке, отличной от раковой.

[0052] 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 некоторых аспектах 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).

[0053] В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению может быть применен для предупреждения начала развития рака, предусматривающего раковую клетку, которая экспрессирует В7-Н4. 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 некоторых аспектах 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.

[0054] Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения субъекта-млекопитающего. В некоторых аспектах "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 некоторых аспектах субъектом является яванский макак (*Macaca fascicularis*). В предпочтительном аспекте 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 от рака или характеризуется риском его развития. Таким образом, в некоторых аспектах способ по настоящему изобретению может быть применен для подтверждения наличия рака у субъекта. Например, у субъекта ранее мог быть диагностирован рак с помощью альтернативных способов. В некоторых аспектах субъекту ранее вводили средство противораковой терапии.

[0055] В некоторых аспектах в данном документе раскрыт способ лечения рака, выбранного из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточного и/или аденокарциномы), рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого. В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника. В некоторых аспектах способа лечения рака молочной железы рак молочной железы представляет собой положительный по гормональным рецепторам (HR+) рак молочной железы, положительный по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (HER2+) рак молочной железы или трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых аспектах рак молочной железы представляет собой TNBC.

[0056] В некоторых аспектах способа рак представляет собой рак с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD). В некоторых аспектах рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRD, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD выбран из *BRCA1*, *BRCA2*

и *ATM*. В некоторых аспектах мутантный ген *HRD* представляет собой *BRCA1*. В некоторых аспектах мутантный ген *HRD* представляет собой *BRCA2*. В некоторых аспектах мутантный ген *HRD* представляет собой *ATM*.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

[0057] Конъюгаты антитело-лекарственное средство, предусмотренные в данном документе, содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4. 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.

[0058] В некоторых аспектах 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".

[0059] В некоторых аспектах 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".

[0060] В некоторых аспектах 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".

[0061] В некоторых аспектах 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".

[0062] В конкретном аспекте 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.

[0063] Другими словами антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно могут содержать:

- 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.

[0064] В некоторых аспектах 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.

[0065] В некоторых аспектах 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.

[0066] В некоторых аспектах 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.

[0067] В некоторых аспектах 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.

[0068] 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.

[0069] 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.

[0070] 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;

[0071] Подходящие последовательности переменной 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;

[0072] Предпочтительная последовательность переменной 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).

[0073] Например, в некоторых аспектах 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.

[0074] Например, в некоторых аспектах 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.

[0075] Соответствующим образом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

i. вариабельную 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. вариабельную 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.

[0076] Более соответствующим образом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

i. вариабельную 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. вариабельную 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.

[0077] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

– вариабельную область тяжелой (VH) цепи и вариабельную 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.

[0078] В предпочтительном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой (VH) цепи, содержащую аминокислотные последовательности 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.

[0079] В некоторых аспектах 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".

[0080] В некоторых аспектах 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".

[0081] В некоторых аспектах 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 "ZY0E05-E07" или "E05-E07".

[0082] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39 или ее функциональный вариант; и переменную 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".

[0083] В некоторых аспектах 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.

[0084] В некоторых аспектах 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.

[0085] В некоторых аспектах 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.

[0086] В некоторых аспектах 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.

[0087] В предпочтительном аспекте 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".

[0088] В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[0089] 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.

[0090] В некоторых аспектах 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 аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь (например, содержащую VL и константную область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

[0091] В некоторых аспектах 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-Ma1a-тяжелая цепь".

[0092] В некоторых аспектах 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".

[0093] В некоторых аспектах 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".

[0094] В предпочтительном аспекте 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 аспекте 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".

[0095] В некоторых аспектах 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 аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

[0096] В некоторых аспектах 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.

[0097] В предпочтительном аспекте 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.

[0098] Было успешно продемонстрировано, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно формуле настоящего изобретения могут нацеливаться на более широкий спектр экспрессирующих B7-H4 клеток по сравнению с существующими (коммерчески) доступными антителами, которые, как сообщается, нацеливаются на B7-H4. Таким образом, не только было продемонстрировано, что антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), раскрытые в данном документе, обладают аффинностью и специфичностью в отношении клинически значимой мишени, но также было продемонстрировано, что они обладают уникальным преимуществом (например, неожиданным техническим эффектом), ассоциированным с этим.

[0099] 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).

[0100] 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).

[0101] Термин "эпитоп" относится к области белка-мишени (например, полипептида), способной связываться с (например, быть связанной) антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

[0102] В некоторых аспектах 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, B0000-35B, 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, B0000-35B, 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.

[0103] В предпочтительном аспекте 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.

[0104] 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 (H74) от eBioscience". Указанное антитело доступно от ThermoFisher Scientific (№ по каталогу 14-5949-82).

[0105] В другом предпочтительном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с линией клеток OVCAR4 с более высокой аффинностью по сравнению с B0000-35B, представляющим собой IgG мыши к В7Н4 человека, от US biological.

[0106] Указанная аффинность (например, аффинность связывания) может быть измерена любым подходящим способом измерения аффинности связывания, описанным в данном документе.

[0107] 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.

[0108] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

[0109] "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')₂, 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.

[0110] В предпочтительном аспекте 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.

[0111] Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, полученному из иммуноглобулина, отличного от человеческого (например, мышинового), которое было сконструировано с содержанием минимального количества последовательностей, отличных от человеческих (например, мышинных). Гуманизованные антитела, как правило, 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; Verhoeyen 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.

[0112] Гуманизированные антитела могут быть дополнительно модифицированы 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, как правило иммуноглобулина человека. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патентах США №№ 5225539 или 5639641.

[0113] "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 сайта 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*, (5-ое изд., 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.

[0114] Обычно при обозначении остатка в переменной 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*, 5-ое изд., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0115] Нумерация положений аминокислот согласно Kabat относится к системе нумерации, применяемой к переменным доменам тяжелой цепи или переменным доменам легкой цепи антител в соответствии с собранными сведениями в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., 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 варибельного домена или вставке в них. Например, варибельный 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.

[0116] 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 местоположение структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации с применением 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 гиперварибельных 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 варибельные 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 ¹	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
HCDR1 ²	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

¹ Нумерация по Kabat

² Нумерация по Chothia

[0117] ImMunoGeneTics (IMGT) также представляет систему нумерации для варибельных 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 гипервариабельных 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.

[0118] 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.

[0119] В некоторых аспектах антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело человека.

[0120] 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.

[0121] В некоторых аспектах антитело по настоящему изобретению представляет собой химерное антитело.

[0122] 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.

[0123] 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 время полужизни антител в сыворотке крови примерно в четыре раза по сравнению с таковым для вариантов дикого типа того же антитела (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 посредством ссылки во всей своей полноте.

[0124] Соответственно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связываются с молекулой B7-H4 с достаточной аффинностью, чтобы антитело являлось применимым в качестве терапевтического средства или диагностического реагента в отношении нацеливания на B7-H4.

[0125] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 (предпочтительно B7-H4 человека) с константой диссоциации (KD), составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, ≤ 10 пМ, ≤ 1 пМ или $\leq 0,1$ пМ. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 (предпочтительно B7-H4 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.

[0126] В предпочтительном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 (предпочтительно B7-H4 человека) с KD, составляющей от приблизительно 23 нМ до приблизительно 27 нМ. В более предпочтительном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с B7-H4 (предпочтительно B7-H4 человека) с KD, составляющей от приблизительно 1 нМ до приблизительно 1,5 нМ.

[0127] 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.

[0128] В некоторых аспектах 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), VIACORE® (с применением рекомбинантного В7-Н4 в качестве аналита и антитела в качестве лиганда или наоборот), KINEXA®, системы ForteBio Octet или других анализов связывания, известных их уровня техники.

[0129] В некоторых аспектах 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 ВТН1А1 человека, молекулы ННЛА2 человека, молекулы ВТН3А2 человека или их комбинации. В предпочтительном аспекте 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.

[0130] 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.

[0131] В некоторых аспектах 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 аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с молекулой В7-Н1 человека, молекулой В7-Н2 человека или молекулой В7-Н3 человека.

[0132] В некоторых аспектах полипептид В7-Н4 содержится в пределах полипептидной последовательности В7-Н4 или ее фрагмента.

[0133] "Полипептид В7-Н4" может содержать полноразмерную полипептидную последовательность В7-Н4 (например, последовательность 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.

Характеристики антител и антигенсвязывающих фрагментов

[0134] 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.

[0135] Термин "антитело" распространяется на моноклональные антитела и их фрагменты (например, проявляющие требуемую биологическую активность). В предпочтительном аспекте антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. В более предпочтительном аспекте антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело. В некоторых аспектах в способах по настоящему изобретению могут использоваться поликлональные антитела.

[0136] 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 "области, определяющие комплементарность" ("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, CDR1, FR2, DR2, FR3, CDR3, FR4. VHC- или VLC-цепи антитела могут дополнительно содержать всю

или часть константной области тяжелой или легкой цепей. В некоторых аспектах 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')₂-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, могут быть соединены 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 одновалентных молекул (известных как одноцепочечные 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.

[0137] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одно или несколько, выбранные из антитела мыши, гуманизованного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела,

поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, полиспецифического антитела, или их комбинацию.

[0138] В некоторых аспектах антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один или несколько, выбранные из Fv-фрагмента, Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fab'-фрагмента, dsFv-фрагмента, scFv-фрагмент, sc(Fv)₂-фрагмента, или их комбинацию.

[0139] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, mAb) по настоящему изобретению представляют собой scFV.

[0140] В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах антитело или фрагмент могут связываться с B7-H4 человека и B7-H4 яванского макака. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент также могут связываться с B7-H4 мыши.

[0141] В некоторых аспектах 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.

[0142] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать, в дополнение к VH и VL, константную область тяжелой цепи или ее фрагмент. В некоторых аспектах константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи человека, например, константную область IgG человека, например, константную область IgG1 человека. В некоторых аспектах (предпочтительно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы со средством, таким как цитотоксическое средство) между аминокислотами S239 и V240 в области CH2 IgG1 вставлен остаток цистеина. Этот цистеин обозначается как "239-вставка" или "239i".

[0143] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может 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.

[0144] 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 может содержать последовательность VH-цепи под SEQ ID NO: 45, например, полученную путем обратной мутации к зародышевому типу, под SEQ ID NO: 43, и последовательность VL-цепи под

SEQ ID NO: 34. E02-GL также может содержать последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 51 и последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 44. "Клон E02-GL", конъюгированный с полезной нагрузкой топоизомеразы I SG3932, как описано в данном документе, обозначается как "E02-GL-SG3932". В одном аспекте клон E02-GL конъюгирован с полезной нагрузкой топоизомеразы I SG3932 при среднем соотношении лекарственного средства и антитела (DAR), составляющем 8.

[0145] В некоторых аспектах 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 увеличенным 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 некоторых аспектах 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 аспекте 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 некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, где тяжелая цепь представляет собой мутантный вариант YTE IgG1 человека.

[0146] В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой каппа/лямбда-цепи, например, константную область каппа-цепи человека или константную область лямбда-цепи человека.

[0147] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

[0148] В некоторых аспектах аминокислотная последовательность VH и/или VL может характеризоваться 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходством с последовательностью, изложенной в данном документе. В некоторых аспектах аминокислотная последовательность VH и/или VL может предусматривать наличие 1, 2, 3, 4, 5 или больше замен, например, консервативных замен, по сравнению с последовательностью, изложенной 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.

[0149] 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.

[0150] В некоторых аспектах 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.

Расщепляемые линкеры и цитотоксические средства

[0151] В некоторых аспектах конъюгатов антитело-лекарственное средство, раскрываемых в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с цитотоксическим средством с помощью линкера. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксическим средством с помощью линкера. Как применяется в данном документе, термин "конъюгированный" означает связанный посредством ковалентной или ионной связи. Цитотоксическое средство может называться в данном документе "средством" или "активным средством". В некоторых аспектах цитотоксическое средство представляет собой лекарственное средство.

[0152] В некоторых аспектах цитотоксическое средство в ADC (также иногда называемое "поражающим элементом") представляет собой одно из цитотоксических средств, раскрытых в опубликованной международной заявке WO 2020/200880, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0153] 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, аманитины, 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, СС-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.

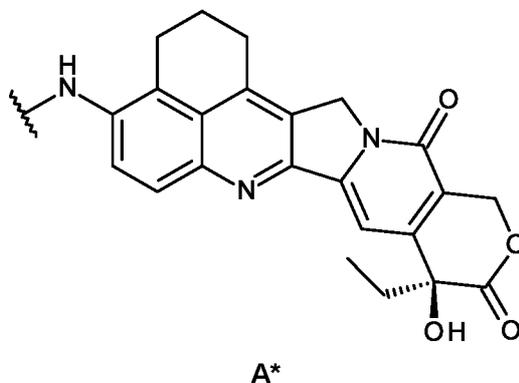
[0154] В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или несколькими гетерологичными средствами, выбранными из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I, производного тубулизина, пирролобензодиазепина, противомикробного средства, терапевтического средства, 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.

[0155] В некоторых аспектах 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.

[0156] В предпочтительных аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент 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.

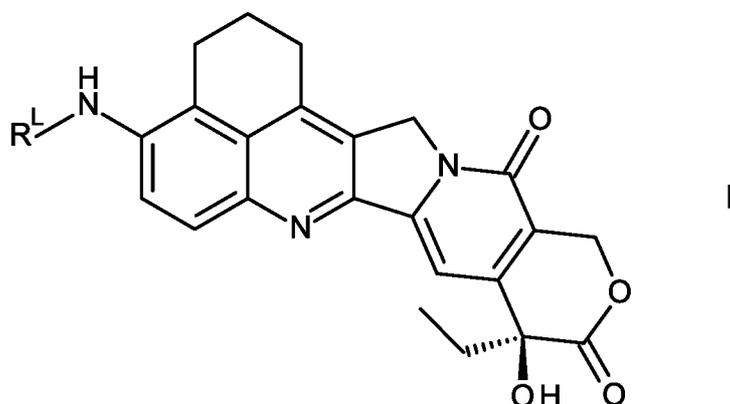
[0157] Общий пример подходящего ингибитора топоизомеразы I представлен следующим соединением A*:



которое может называться в данном документе "звено, представляющее собой лекарственное средство".

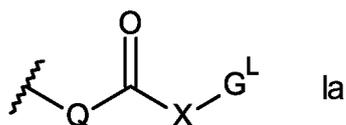
[0158] Соединение (например, A*) предпочтительно представлено с линкером для соединения (предпочтительно конъюгировано) с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (оно может называться "звеном, представляющим собой лиганд"). Соответственно, линкер присоединен (например, конъюгирован) с возможностью расщепления к аминокислотному остатку, например, аминокислоте антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе.

[0159] Более конкретно пример подходящего ингибитора топоизомеразы I представлен следующим соединением с формулой "I":



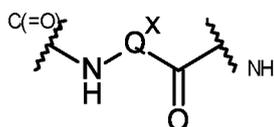
и его солями и сольватами, где R^L представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд), где указанный линкер предпочтительно выбран из

(ia):



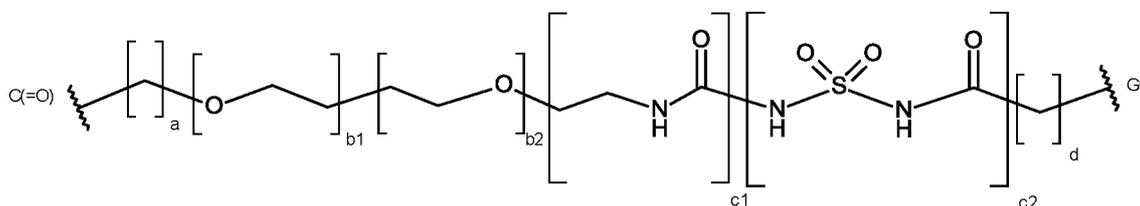
где

Q представляет собой:



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

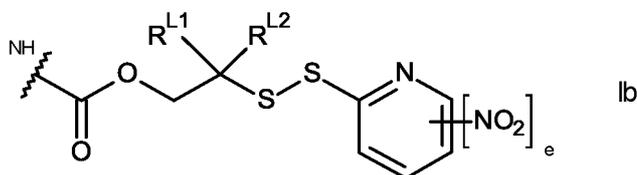
X представляет собой:



где a составляет 0-5, b1 составляет 0-16, b2 составляет 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d составляет 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):



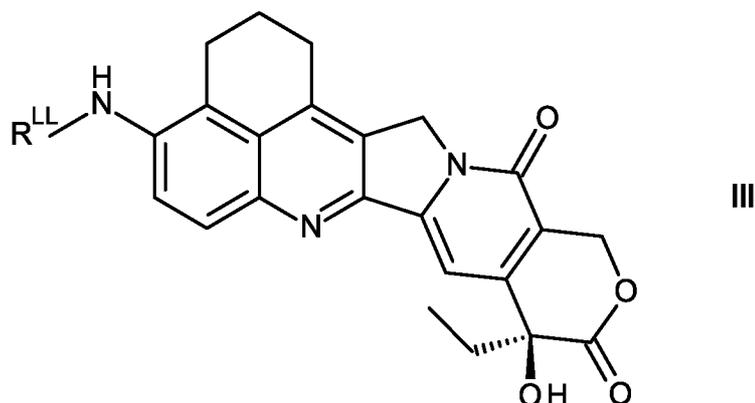
где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

[0160] 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).

[0161] Например, конъюгат (например, конъюгат антитело-лекарственное средство) по настоящему изобретению может представлять собой конъюгат с общей формулой IV:

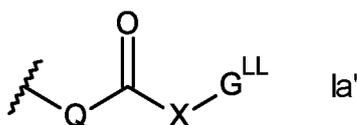


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, звено, представляющее собой лиганд), D^L представляет собой ингибитор топоизомеразы I с линкером (например, звено, представляющее собой лекарственное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



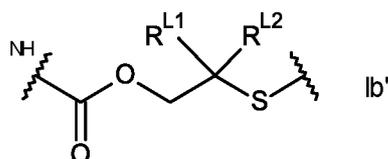
R^{LL} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд), где линкер предпочтительно выбран из

(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

(ib'):



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

[0162] Нагрузка лекарственным средством представлена с помощью p , числа 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.

[0163] Следовательно, аспекты раскрытых в данном документе ADC охватывают 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, аспекты раскрытых в данном документе ADC охватывают 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, способы, описанные в данном документе, могут быть применены для 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), как обсуждается в других частях данного документа.

[0164] Определенные признаки ингибиторов топоизомеразы I, описанные выше, являются особенно предпочтительными и могут быть определены более подробно, как изложено ниже. В качестве примера будет приведен предпочтительный аспект признака Q^X (например, в пределах линкера 1a, описанного выше).

[0165] Следующие предпочтения могут быть применены ко всем аспектам способов, комбинаций и наборов, описанных в данном документе, или они могут относиться к отдельному аспекту. Предпочтения могут быть объединены вместе в любой комбинации.

Q^X

[0166] В некоторых аспектах 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.

[0167] В некоторых аспектах Q предусматривает дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых аспектах 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.

[0168] В некоторых аспектах Q выбран из

$NH\text{-Phe-Lys-}C=O$,

$NH\text{-Val-Ala-}C=O$,

$NH\text{-Val-Lys-}C=O$,

$NH\text{-Ala-Lys-}C=O$,

$NH\text{-Val-Cit-}C=O$,

$NH\text{-Phe-Cit-}C=O$,

$NH\text{-Leu-Cit-}C=O$,

$NH\text{-Ile-Cit-}C=O$,

$NH\text{-Phe-Arg-}C=O$,

$NH\text{-Trp-Cit-}C=O$ и

$NH\text{-Gly-Val-}C=O$;

где Cit представляет собой цитруллин.

[0169] Предпочтительно Q выбран из

$NH\text{-Phe-Lys-}C=O$,

$NH\text{-Val-Ala-}C=O$,

$NH\text{-Val-Lys-}C=O$,

$NH\text{-Ala-Lys-}C=O$ и

$NH\text{-Val-Cit-}C=O$.

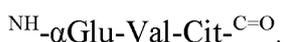
[0170] Более предпочтительно Q выбран из NH-Phe-Lys-C=O , NH-Val-Cit-C=O или NH-Val-Ala-C=O .

[0171] Другие подходящие комбинации дипептидов включают

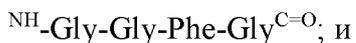


[0172] Могут быть применены другие комбинации дипептидов, в том числе комбинации, описанные в работе Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0173] В некоторых аспектах Q представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и не природных аминокислот. В некоторых аспектах 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



[0174] В некоторых аспектах Q представляет собой тетрапептидный остаток. Аминокислоты в тетрапептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и не природных аминокислот. В некоторых аспектах 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

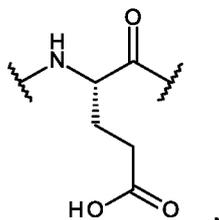


[0175] В некоторых аспектах тетрапептид представляет собой

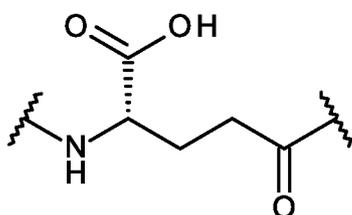


[0176] На представленных выше изображениях пептидных остатков NH_2 представляет собой N-конец, и $-\text{C}=\text{O}$ представляет собой C-конец остатка. C-конец связан с NH из A*.

[0177] Glu представляет собой остаток глутаминовой кислоты, т. е.



α Glu представляет собой остаток глутаминовой кислоты при связывании посредством α -цепи, т. е.:



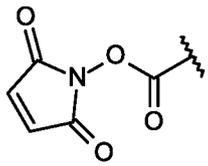
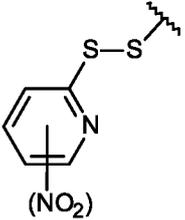
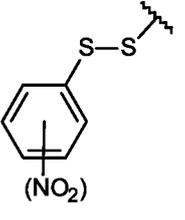
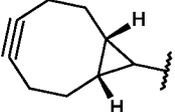
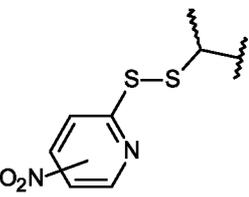
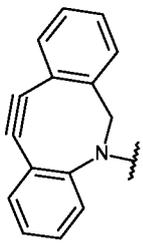
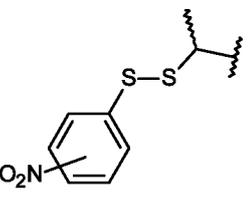
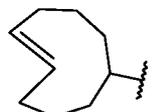
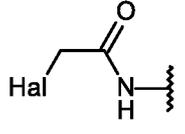
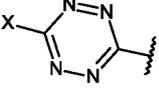
[0178] В некоторых аспектах при необходимости боковая цепь аминокислоты является химически защищенной. Защитная группа для боковой цепи может представлять собой группу, рассмотренную выше. Защищенные аминокислотные последовательности являются расщепляемыми с помощью ферментов. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с защитой боковой цепи с помощью Boc, является расщепляемой с помощью катепсина.

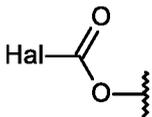
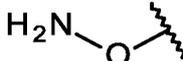
[0179] Защитные группы для боковых цепей аминокислот широко известны из уровня техники, описаны в каталоге Novabiochem и являются такими, как описано выше.

G^L

[0180] G^L может быть выбран из

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	

(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-1})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L9})	
(G ^{L3-2})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L10})	
(G ^{L3-3})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L11})	
(G ^{L3-4})	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 <p>где Hal представляет собой I, Br, Cl</p>	(G ^{L13})	

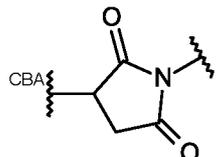
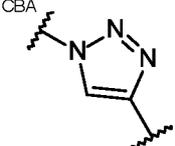
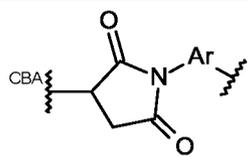
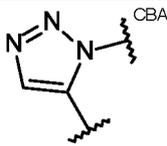
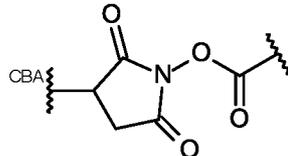
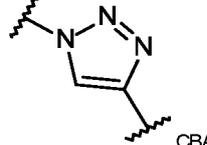
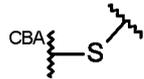
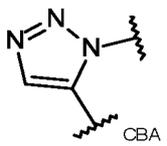
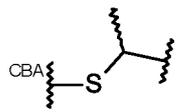
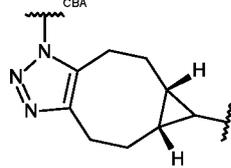
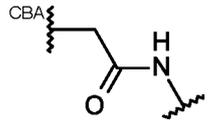
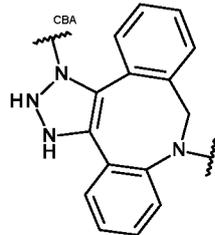
(G^{L5})		$(G^{L14}),$	
------------	---	--------------	---

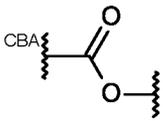
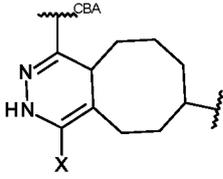
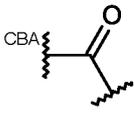
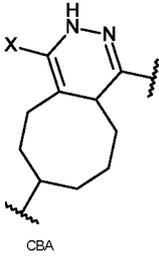
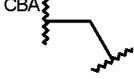
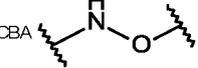
где Ar представляет C_{5-6} -ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет C_{1-4} -алкил.

[0181] В некоторых аспектах G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2} . В некоторых из данных аспектов G^L представляет собой G^{L1-1} .

G^{LL}

[0182] G^{LL} может быть выбран из

(G^{LL1-1})		$(G^{LL8-1}),$	
(G^{LL1-2})		$(G^{LL8-2}),$	
(G^{LL2})		$(G^{LL9-1}),$	
(G^{LL3-1})		$(G^{LL9-2}),$	
(G^{LL3-2})		$(G^{LL10}),$	
(G^{LL-4})		$(G^{LL11}),$	

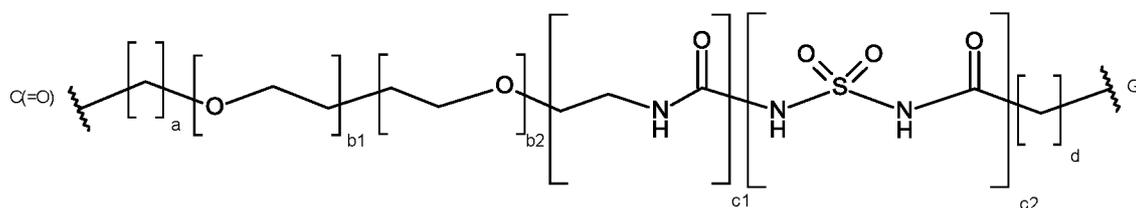
(G^{LL5})		$(G^{LL12}),$	
(G^{LL6})		$(G^{LL13}),$	
(G^{LL7})		$(G^{LL14}),$	

где Ag представляет C_{5-6} ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет C_{1-4} алкил.

[0183] В некоторых аспектах G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2} . В некоторых из данных аспектов G^{LL} представляет собой G^{LL1-1} .

X

[0184] X предпочтительно представляет собой



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

a может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых аспектах a равняется 0-3. В некоторых из данных аспектов a равняется 0 или 1. В дополнительных аспектах a равняется 0.

b1 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых аспектах b1 равняется 0-12. В некоторых из данных аспектов b1 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

b2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых аспектах b2 равняется 0-12. В некоторых из данных аспектов b2 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8. Предпочтительно только один из b1 и b2 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 аспектах d равняется 0-3. В некоторых из данных аспектов d равняется 1 или 2. В дополнительных аспектах d равняется 2. В дополнительных аспектах d равняется 5.

[0185] В некоторых аспектах 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 аспектов b_2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых аспектах 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 аспектов b_1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых аспектах 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 аспектов b_2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых аспектах 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 аспектов другой из a и d равняется 1. В других из данных аспектов другой из a и d равняется 5. В некоторых аспектах X a равняется 1, b_2 равняется 0, c_1 равняется 0, c_2 равняется 1, d равняется 2, и b_1 может равняться 0-8. В некоторых из данных аспектов b_2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

[0186] В некоторых аспектах R^L представлен формулой Ib . В некоторых аспектах R^{LL} представлен формулой Ib' .

[0187] R^{L1} и R^{L2} могут быть независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

[0188] В некоторых аспектах как R^{L1} , так и R^{L2} представляют собой H . В некоторых аспектах R^{L1} представляет собой H , и R^{L2} представляет собой метил. В некоторых аспектах как R^{L1} , так и R^{L2} представляют собой метил.

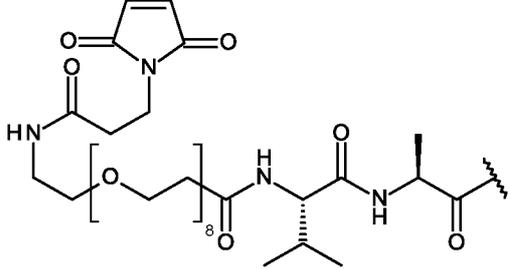
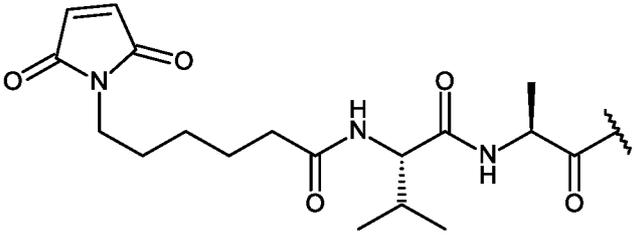
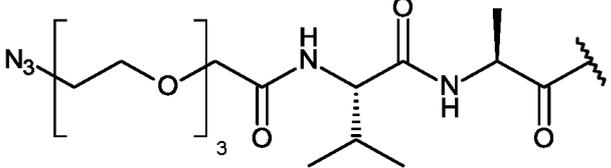
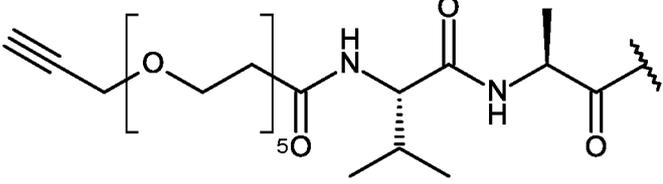
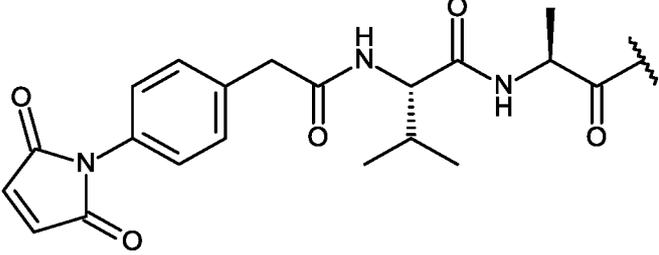
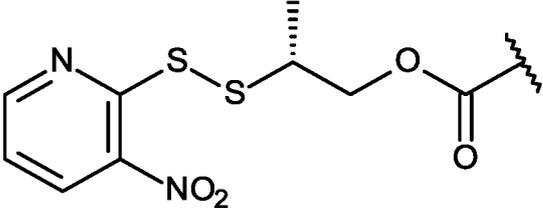
[0189] В некоторых аспектах R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу. В некоторых аспектах R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

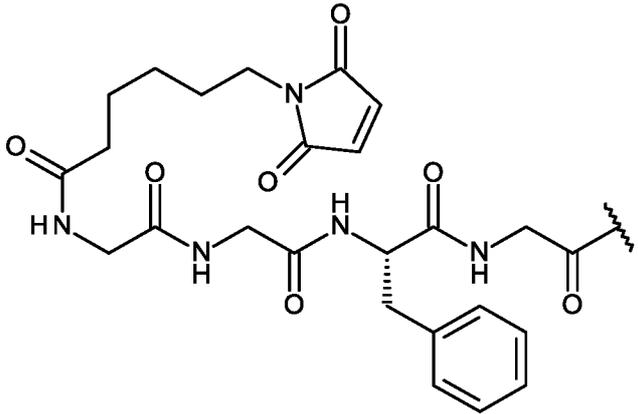
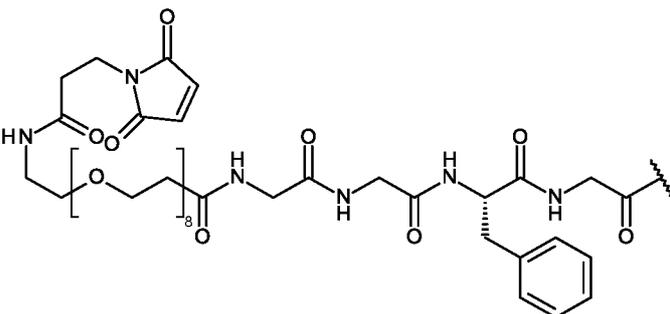
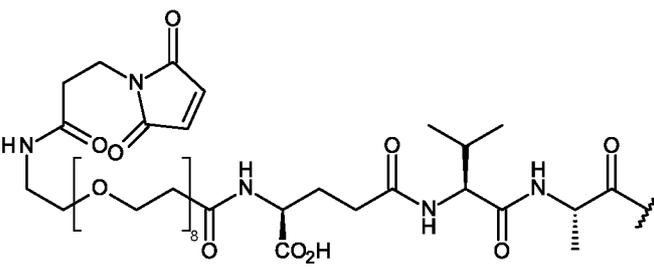
[0190] В группе Ib в некоторых аспектах e равняется 0. В других аспектах e равняется 1, и нитрогруппа может находиться в любом доступном положении кольца. В некоторых из данных аспектов она находится в орто-положении. В других из данных аспектов она находится в пара-положении.

[0191] В некоторых аспектах, где описанные в данном документе соединения представлены в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме, энантиомерно обогащенная форма характеризуется соотношением энантиомеров,

превышающим 60:40, 70:30; 80:20 или 90:10. В дополнительных аспектах соотношение энантимеров превышает 95:5, 97:3 или 99:1.

[0192] В некоторых аспектах R^L выбран из

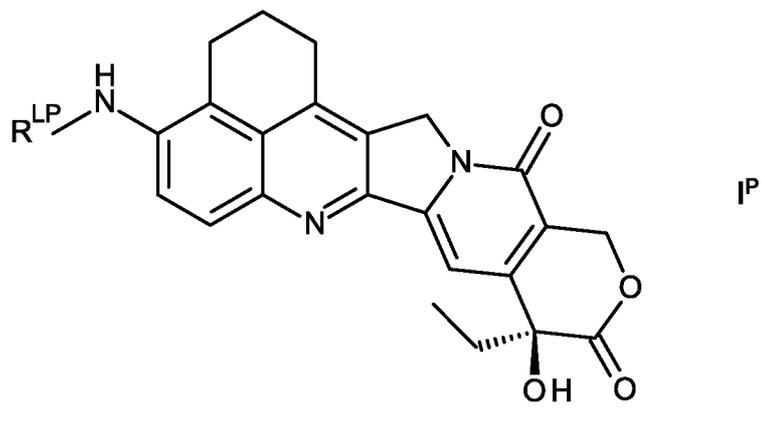
(i)	
(ii)	
(iii)	
(iv)	
(v)	
(vi)	

(vii)	
(viii)	
(ix)	

[0193] В некоторых аспектах RLL представляет собой группу, полученную из указанных выше групп RL.

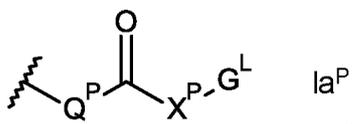
[0194] Учитывая приведенные вышеуказанные предпочтения, далее будут описаны определенные предпочтительные формулы топоизомеразы I-линкер (например, звено, представляющее собой лекарственное средство-линкер).

[0195] В некоторых аспектах соединение формулы I представляет собой соединение формулы I^P:



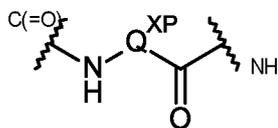
и его соли и сольваты, где R^{LP} представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, где указанный линкер выбран из

(ia):



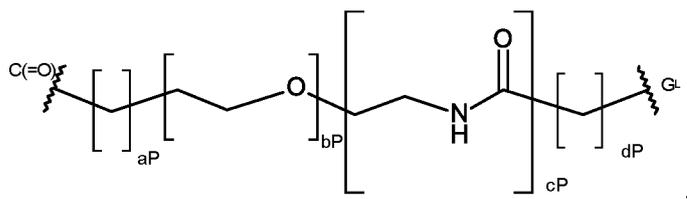
где

Q^P представляет собой:



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

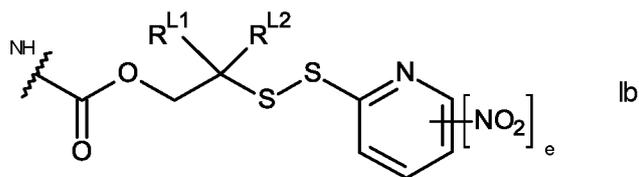
X^P представляет собой:



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 аспектах aP равняется 0-3. В некоторых из данных аспектов aP равняется 0 или 1. В дополнительных аспектах 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 аспектах b равняется 0-12. В некоторых из данных аспектов 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 аспектах dP равняется 0-3. В некоторых из данных аспектов dP равняется 1 или 2. В дополнительных аспектах dP равняется 2.

[0196] В некоторых аспектах X^P aP равняется 0, cP равняется 1, и dP равняется 2, и bP может равняться 0-8. В некоторых из данных аспектов bP равняется 0, 4 или 8.

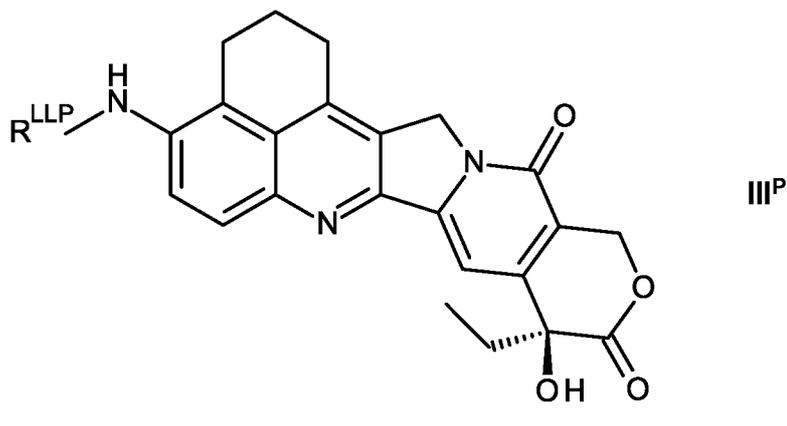
[0197] Предпочтения, касающиеся Q^X , указанного выше для соединений формулы **I**, могут применяться в отношении Q^{XP} (например, при необходимости).

[0198] Предпочтения, касающиеся G^L , R^{L1} , R^{L2} и e , указанных выше для соединений формулы **I**, могут применяться в отношении соединений формулы **I^P**.

[0199] В некоторых аспектах конъюгат формулы **IV** представляет собой конъюгат формулы **IV^P**:

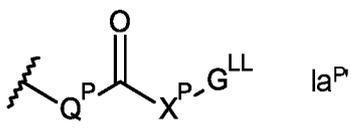


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, звено, представляющее собой лиганд), D^{LP} представляет собой ингибитор топоизомеразы I (например, звено, представляющее собой лекарственное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



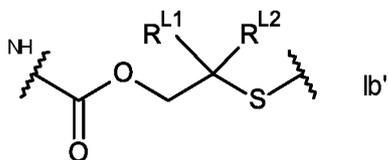
R^{LLP} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, звеном, представляющим собой лиганд), где указанный линкер выбран из

(ia'):



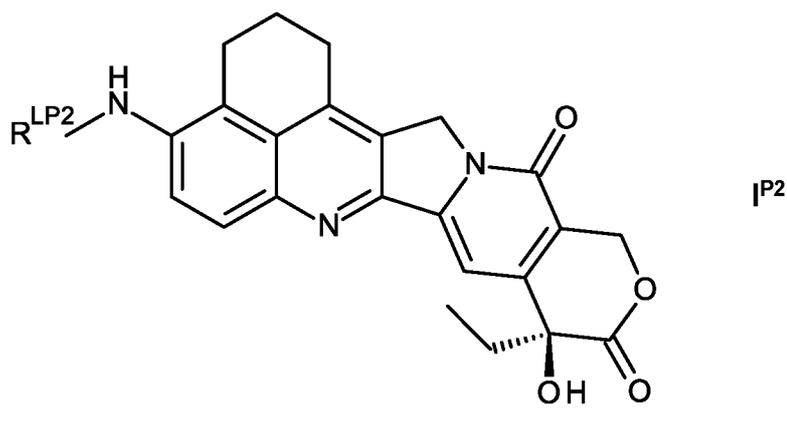
где Q^P и X^P являются такими, как определено выше, и G^{LL} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе (например, звеном, представляющим собой лиганд); и

(ib'):



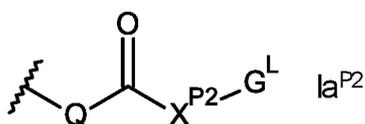
где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено выше; и n представляет собой целое число от 1 до 20.

[0200] В некоторых аспектах соединение формулы **I** представляет собой соединение формулы **I^{P2}**:



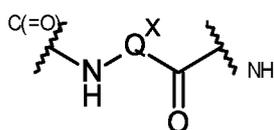
и его соли и сольваты, где R^{LP2} представляет собой линкер для соединения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в данном документе, где указанный линкер выбран из

(ia):



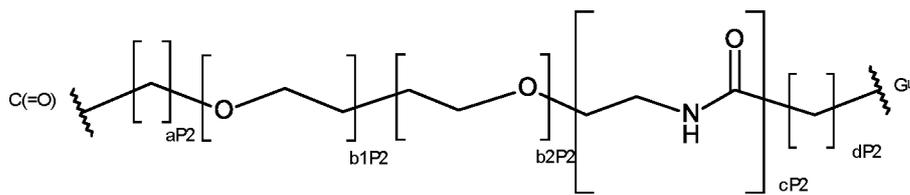
где

Q представляет собой:



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

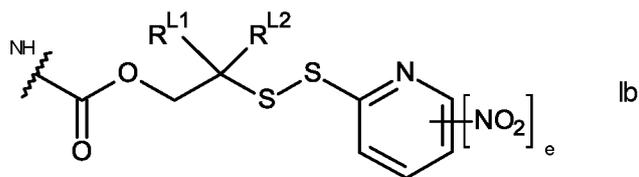
X^{P2} представляет собой:



где $aP2$ равняется 0-5, $b1P2$ равняется 0-16, $b2P2$ равняется 0-16, $cP2$ равняется 0 или 1, $dP2$ равняется 0-5, при этом 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.

[0201] aP2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых аспектах aP2 равняется 0-3. В некоторых из данных аспектов aP2 равняется 0 или 1. В дополнительных аспектах aP2 равняется 0.

[0202] b1P2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых аспектах b1P2 равняется 0-12. В некоторых из данных аспектов b1P2 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

[0203] b2P2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых аспектах b2P2 равняется 0-12. В некоторых из данных аспектов b2P2 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

[0204] Предпочтительно только один из b1P2 и b2P2 может не равняться 0.

[0205] cP2 может равняться 0 или 1.

[0206] dP2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых аспектах dP2 равняется 0-3. В некоторых из данных аспектов dP2 равняется 1 или 2. В дополнительных аспектах dP2 равняется 2. В дополнительных аспектах dP2 равняется 5.

[0207] В некоторых аспектах 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 аспектов b2P2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых аспектах 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 аспектов b1P2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых аспектах 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 аспектов b2P2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8. В некоторых аспектах 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 аспектов другой из aP2 и d равняется 1. В других из данных аспектов другой из aP2 и dP2 равняется 5.

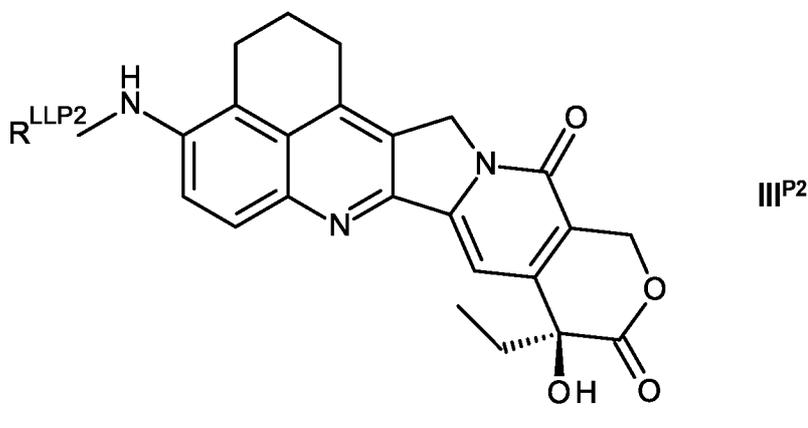
[0208] Предпочтения, касающиеся Q^X, указанного выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении Q^X в формуле Ia^{P2} (например, при необходимости).

[0209] Предпочтения, касающиеся G^L , R^{L1} , R^{L2} и e , указанных выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении соединений формулы I^{P2} .

[0210] В некоторых аспектах конъюгат формулы IV представляет собой конъюгат формулы IV^{P2} :

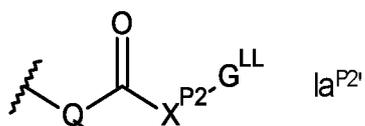


или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе (например, звено, представляющее собой лиганд), D^{LP2} представляет собой ингибитор топоизомеразы I (например, звено, представляющее собой лекарственное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



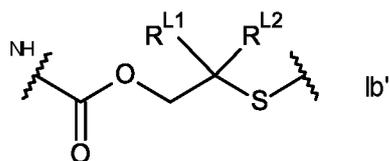
R^{LLP2} представляет собой линкер, соединенный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, звеном, представляющим собой лиганд), где указанный линкер выбран из

(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

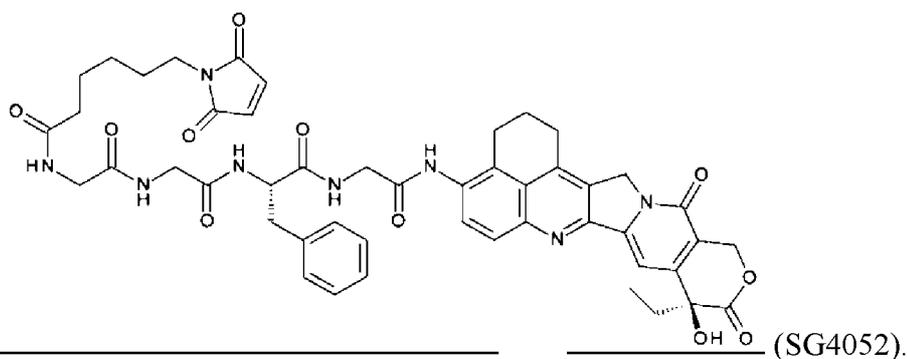
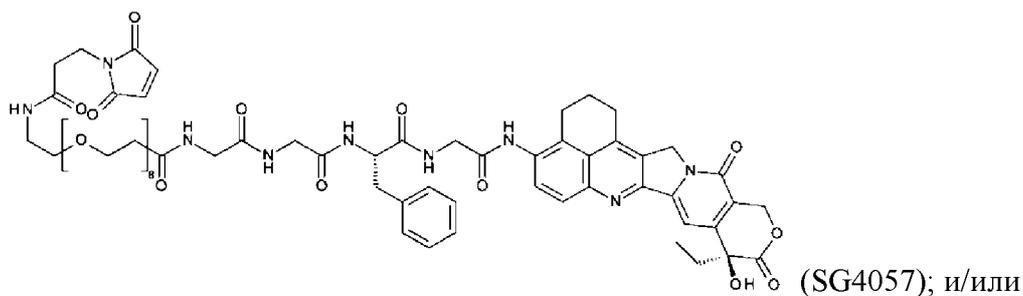
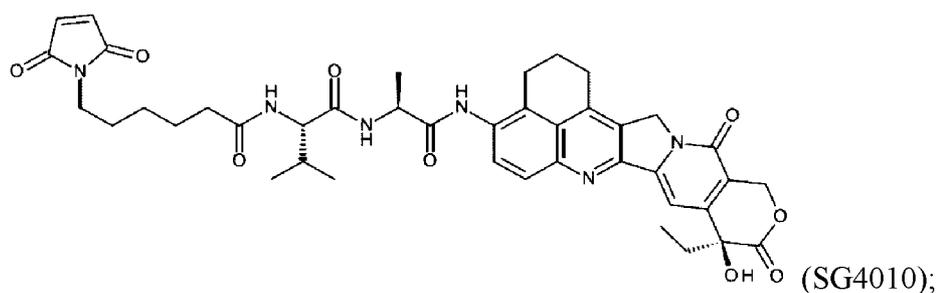
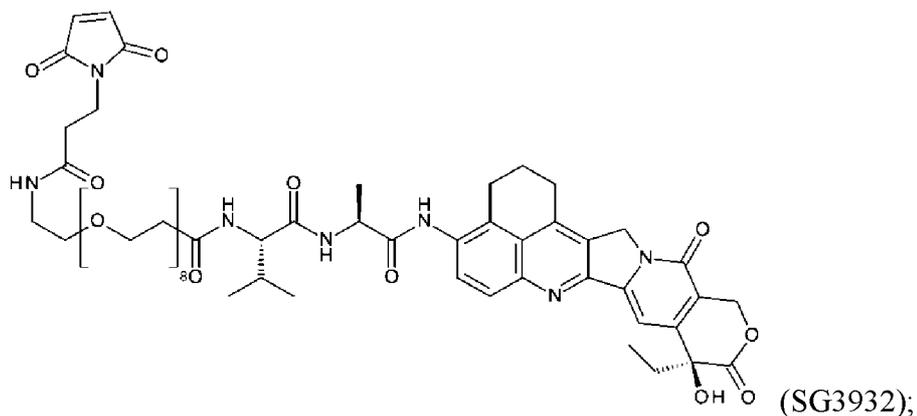
(ib')



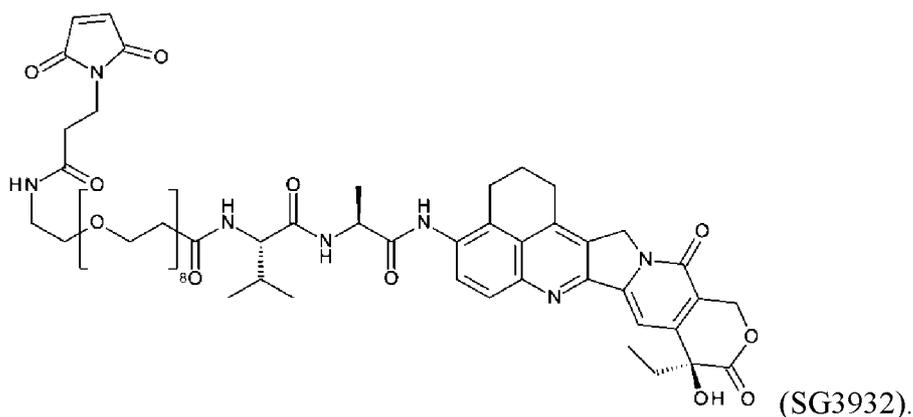
где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено выше; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

[0211] В некоторых аспектах линкер представляет собой линкер mp-PEG8-val-ala. Как указано в названии, линкер mp-PEG8-val-ala содержит 8 последовательных полиэтиленгликолевых звеньев, за которыми следует дипептид валин-аланин (val-ala), который присоединяется к цитотоксическому средству.

[0212] В некоторых аспектах линкер и цитотоксическое средство вместе предусматривают одно из следующих соединений:



[0213] В некоторых аспектах линкер и цитотоксическое средство вместе предусматривают SG3932:



Соотношение лекарственного средства и антитела

[0214] 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).

[0215] 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 p также может быть определено. Посредством ELISA может быть определено усредненное значение p в конкретном 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 p 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.

[0216] 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.

[0217] В случае если более чем одна нуклеофильная или электрофильная группа антитела или его антигенсвязывающего фрагмента реагирует со средством, то полученный продукт может представлять собой смесь соединений ADC с распределением звеньев, представляющих собой средство, присоединенных к антителу, например, 1, 2, 3 и т. д. Пособием 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.

[0218] 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 различным аминокислотным остаткам.

[0219] В некоторых аспектах среднее количество средств на антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых аспектах 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 аспектах присутствует одно средство на антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент). В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах настоящего изобретения DAR находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах DAR составляет от приблизительно 1 до

приблизительно 8. В конкретном аспекте настоящего изобретения DAR составляет приблизительно 8. В конкретном аспекте настоящего изобретения DAR составляет 8.

Введение и фармацевтически приемлемые соединения для ADC

[0220] В некоторых аспектах ADC доставляется непосредственно в место расположения вредной клеточной популяции (например, с обеспечением таким образом увеличения уровня воздействия терапевтического средства на пораженную заболеванием ткань). В некоторых аспектах введение осуществляется непосредственно в дыхательный путь, например, путем ингаляции или интраназального введения.

[0221] ADC, описанный в данном документе, может содержаться в фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В некоторых аспектах 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 22-ое изд., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

[0222] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция ADC по настоящему изобретению может содержаться в одном или нескольких составах, выбранных из капсулы, таблетки, водной суспензии, раствора, назального аэрозоля или их комбинации.

[0223] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция ADC содержит более чем один тип ADC. Например, фармацевтическая композиция может содержать два или более ADC, имеющих разные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, линкеры или цитотоксические средства или разные их комбинации.

[0224] 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.

[0225] В некоторых аспектах 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.

Получение антител

[0226] Антитела по настоящему изобретению могут быть получены 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.

[0227] 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 путем инъекции 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 гибридомами, 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.

[0228] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть получены в виде моноклонального антитела к B7-H4, которое может быть получено с применением гибридных способов, таких как способы, описанные в работе 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.

[0229] В качестве альтернативы, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, в виде моноклональных антител) также могут быть получены 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 (CHO) 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).

[0230] Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующий(кодирующие) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, можно дополнительно модифицировать посредством ряда разных способов с применением технологии рекомбинантных ДНК для получения альтернативных антител. В некоторых аспектах константные домены легкой и тяжелой цепей, например, моноклонального антитела мыши могут быть заменены (1) на такие области, например, антитела человека с получением химерного антитела или (2) на отличный от иммуноглобулина полипептид с получением слитого антитела. В некоторых аспектах константные области усекают или удаляют 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 вариабельной области.

[0231] В некоторых аспектах 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); Voemer et al., *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); патент США № 5750373.

[0232] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из фаговой библиотеки, при этом 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.

[0233] 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.

[0234] В некоторых аспектах 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, avidности, 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.

[0235] 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 выбрать 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).

[0236] 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 работе Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature

332:323 (1988); Verhoeyen 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.

[0237] 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.

[0238] В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах 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.

[0239] В соответствии с настоящим изобретением методики могут быть адаптированы 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')₂-фрагмент, получаемый посредством расщепления молекулы антитела пепсином; Fab-фрагмент, получаемый посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагмента, Fab-фрагмент, получаемый посредством обработки молекулы антитела папаином и восстановителем, или Fv-фрагменты.

[0240] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть модифицированы 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.

[0241] Модифицированные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, могут содержать вариабельную область любого типа, которая обеспечивает ассоциацию антитела или полипептида с В7-Н4. В связи с этим вариабельная 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, вариабельная 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 некоторых аспектах как вариабельные, так и константные области модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента являются человеческими. В некоторых аспектах вариабельные области совместимого антитела (обычно полученные из источника, отличного от человека) могут быть сконструированы или специфически оптимизированы с целью улучшения свойств связывания или снижения иммуногенности молекулы. В связи с этим вариабельные области, применимые в настоящем изобретении, могут быть гуманизированы или иным образом изменены посредством включения импортируемых аминокислотных последовательностей.

[0242] В некоторых аспектах переменные домены как тяжелых, так и легких цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изменены 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 согласно некоторым определенным аспектам 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.

[0243] 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 некоторых аспектах константная область модифицированного антитела будет содержать человеческую константную область. Модификации константной области, совместимые с настоящим 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 некоторых аспектах предполагается модифицированная константная область, в которой один или несколько доменов частично или полностью удалены. В некоторых аспектах модифицированное антитело будет содержать конструкции с подвергнутым делеции доменом или варианты, где был удален весь CH2-домен (Δ CH2-

конструкции). В некоторых аспектах исключенный домен константной области может быть замещен коротким аминокислотным спейсером (например, из 10 остатков), что обеспечивает некоторую гибкость молекулы, которую, как правило, придает отсутствующая константная область.

[0244] 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 разных 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 разнообразных биологических ответов, включая 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.

[0245] В некоторых аспектах 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 снизить степень связывания циркулирующего модифицированного антитела с Fc-рецепторами. В других случаях модификации константной области, соответствующие настоящему раскрытию, могут ослаблять связывание комплемента и таким образом сокращать период полужизни в сыворотке крови и неспецифическое соединение 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 раскрытием могут быть без труда осуществлены с применением хорошо известных методик биохимической или молекулярной инженерии, которые полностью находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

[0246] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают одной или несколькими эффекторными функциями. Например, в некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают активностью в

виде антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или активностью в виде комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связываются с Fc-рецептором и/или факторами системы комплемента. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают эффекторной функцией.

[0247] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть сконструированы с обеспечением слияния СН3-домена непосредственно с шарнирной областью соответствующих модифицированных антител или их фрагментов. В других конструкциях между шарнирной областью и модифицированными СН2 и/или СН3-доменами может быть вставлен пептидный спейсер. Например, можно обеспечивать экспрессию совместимых конструкций, в которых СН2-домен был подвергнут делеции и оставшийся СН3-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 некоторых аспектах любой спейсер, добавляемый в конструкцию, может быть относительно неиммуногенным или даже исключен с целью сохранения требуемых биохимических свойств модифицированных антител.

[0248] 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 СН2-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 некоторых аспектах 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 некоторых аспектах могут потребоваться вставка или повторение специфических последовательностей, полученных из выбранных доменов константных областей.

[0249] Способы, комбинации и наборы, описанные в данном документе, охватывают варианты и эквиваленты, которые по сути 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 кислую 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.

[0250] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть дополнительно модифицирован 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, 22-ое изд., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

Определения

[0251] Следующие определения, в частности, касаются представленного выше описания ингибиторов топоизомеразы I, и даже более конкретно могут касаться раздела под названием "Дополнительные предпочтения".

[0252] C₅₋₆-арилен: используемый в данном документе термин "C₅₋₆-арилен" относится к двухвалентному фрагменту, полученному посредством удаления двух атомов водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения.

[0253] В данном контексте префиксы (например, C₅₋₆) обозначают число атомов кольца или диапазон значений числа атомов кольца, будь то атомы углерода или гетероатомы.

[0254] Все атомы кольца могут представлять собой атомы углерода, как в "карбоариленовых группах", в таком случае группа представляет собой фенилен (C₆).

[0255] В качестве альтернативы, атомы кольца могут включать один или несколько гетероатомов, как в "гетероариленовых группах". Примеры гетероариленовых групп включают без ограничения группы, полученные из

N₁: пиррола (азола) (C₅), пиридина (азина) (C₆);

O₁: фурана (оксола) (C₅);

S₁: тиофена (тиола) (C₅);

N₁O₁: оксазола (C₅), изоксазола (C₅), изоксазина (C₆);

N₂O₁: оксадиазола (фуразана) (C₅);

N₃O₁: оксатриазола (C₅);

N₁S₁: тиазола (C₅), изотиазола (C₅);

N₂: имидазола (1,3-диазола) (C₅), пиразола (1,2-диазола) (C₅), пиридазина (1,2-диазина) (C₆), пиримидина (1,3-диазина) (C₆) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C₆); и

N₃: триазола (C₅), триазина (C₆).

[0256] C₁₋₄-алкил: применяемый в данном документе термин "C₁₋₄-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). Применяемый в данном документе термин "C_{1-n}-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.

[0257] Примеры насыщенных алкильных групп включают без ограничения метил (C_1), этил (C_2), пропил (C_3) и бутил (C_4).

[0258] Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают без ограничения метил (C_1), этил (C_2), н-пропил (C_3) и н-бутил (C_4).

[0259] Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изо-пропил (C_3), изо-бутил (C_4), втор-бутил (C_4) и трет-бутил (C_4).

[0260] C_{2-4} алкенил: используемый в данном документе термин " C_{2-4} алкенил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных двойных связей.

[0261] Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают без ограничения этенил (винил, $-CH=CH_2$), 1-пропенил ($-CH=CH-CH_3$), 2-пропенил (аллил, $-CH_2-CH=CH_2$), изопропенил (1-метилвинил, $-C(CH_3)=CH_2$) и бутенил (C_4).

[0262] C_{2-4} алкинил: используемый в данном документе термин " C_{2-4} алкинил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных тройных связей.

[0263] Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают без ограничения этинил ($-C\equiv CH$) и 2-пропинил (пропаргил, $-CH_2-C\equiv CH$).

[0264] C_{3-4} циклоалкил: используемый в данном документе термин " C_{3-4} циклоалкил" относится к алкильной группе, которая также является циклильной 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.

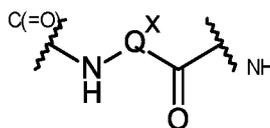
[0265] Примеры циклоалкильных групп включают без ограничения группы, полученные из

насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропана (C_3) и циклобутана (C_4); и

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропена (C_3) и циклобутена (C_4).



[0266] 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

[0267] 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).

[0268] 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 Ca²⁺ и Mg²⁺, и другие катионы, такие как Al⁺³. Примеры подходящих органических катионов включают без ограничения ион аммония (т. е. NH₄⁺) и замещенные ионы аммония (например, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). 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(CH₃)₄⁺.

[0269] Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например, -NH₂ может представлять собой -NH₃⁺), 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.

[0270] Примеры подходящих органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бензойной, камфорсульфоной, коричной, лимонной, эдетовой, этандисульфоновой, этансульфоной, фумаровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изетионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоной, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоной, 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

[0271] Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующего сольвата активного соединения. Термин "сольват" применяется 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

[0272] 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; α - и β -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").

[0273] 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.

[0274] Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичный химический состав, однако различаются расположением атомов или групп в пространстве.

[0275] 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 показателями реакционной способности. Смеси диастереомеров можно разделять с

применением высокочувствительных аналитических процедур, таких как электрофорез и хроматография.

[0276] Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые являются несовпадающими зеркальными отражениями друг друга.

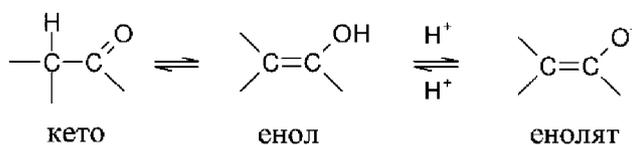
[0277] Стереохимические определения и условные обозначения, применяемые в данном документе, в целом следуют информации, указанной в P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Нью-Йорк; и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John 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.

[0278] Термин "энантиомерно обогащенная форма" относится к образцу хирального вещества, где соотношение энантиомеров составляет более чем 50:50, но менее чем 100:0.

[0279] Следует отметить, что за исключением рассмотренных ниже таутомерных форм, из применяемого 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, C_1 -галкил включает н-пропил и изопропил; бутил включает н-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

[0280] 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.



[0281] Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам, обладающим разными показателями энергии, 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.

[0282] 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 ^1H , ^2H (D) и ^3H (T); C может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; O может находиться в любой изотопной форме, в том числе ^{16}O и ^{18}O , и т. п.

[0283] 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 ^2H (дейтерий, D), ^3H (тритий), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{125}I . Различные изотопно меченые соединения по настоящему изобретению, например, соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{13}C и ^{14}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}F соединение может быть применимо для исследований с применением PET или SPECT. Изотопно меченые соединения по настоящему изобретению и пролекарства их основе обычно могут 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. ^2H 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 конкретный изотоп, представляет собой любой стабильный изотоп данного атома.

[0284] Если не указано иное, ссылка на конкретное 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.

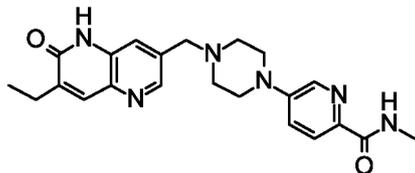
Ингибиторы PARP1

[0285] В некоторых аспектах ADC, описанные в данном документе, вводятся в комбинации с ингибитором PARP1 ((поли(ADP-рибоза)-полимеразы 1). В некоторых аспектах ингибитор PARP1 представляет собой AZD5305. Выражения "ингибировать", "ингибирование" или "осуществление ингибирования" предусматривают снижение

биологической активности или процесса по сравнению с их активностью на исходном уровне.

[0286] Термин "AZD5305" относится к соединению с химическим названием 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид

и показанной ниже структурой:



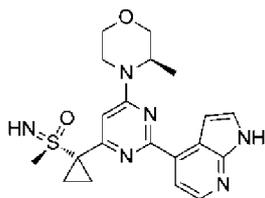
[0287] Получение AZD5305 раскрыто в публикации патентного документа США № US 2021/0040084 A1, раскрытие которого включено посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых аспектах субъекту вводится AZD5305 в форме свободного основания. В некоторых аспектах субъекту вводится фармацевтически приемлемая соль AZD5305. В некоторых аспектах субъекту вводится кристаллический AZD5305. В некоторых аспектах субъекту вводится кристаллическая форма A AZD5305.

[0288] "Фармацевтическая композиция", содержащая AZD5305, включает композиции, содержащие активный ингредиент и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель, где активный ингредиент представляет собой AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль.

Ингибиторы ATR

[0289] В некоторых аспектах ADC, описанный в данном документе, вводится в комбинации с ингибитором ATR (также известным как FRAP-связанный белок 1; FRP1; MEC1; SCKL; SECKL1R). В некоторых аспектах ингибитор ATR представляет собой AZD6738. Выражения "ингибировать", "ингибирование" или "осуществление ингибирования" предусматривают снижение биологической активности или процесса по сравнению с их активностью на исходном уровне.

[0290] Термин "AZD6738" относится к ингибитору ATR (также известного как FRAP-связанный белок 1; FRP1; MEC1; SCKL; SECKL1R), 4-{4-[(3R)-3-метилморфолин-4-ил]-6-[1-((R)-S-метилсульфонимидоил)циклопропил]пиримидин-2-ил}-1H-пирроло[2,3-b]пиридину, представленному следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли. Дополнительные примеры ингибиторов ATR можно найти в патенте США № 8252802, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[0291] "Фармацевтическая композиция", содержащая AZD6738, включает композиции, содержащие активный ингредиент и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель, где активный ингредиент представляет собой AZD6738 или его фармацевтически приемлемую соль.

Комбинации

[0292] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены комбинации ADC и ингибитора PARP1 для лечения рака или комбинации ADC и ингибитора ATR для лечения рака.

[0293] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена комбинация А) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) ингибитора PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1) для лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена комбинация А) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) ингибитора ATR для лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом.

[0294] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена комбинация А) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом.

[0295] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена комбинация А) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие а) 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; b) 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; c) 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; d) 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 e) 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; ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и B) AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом.

[0296] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена комбинация A) ADC, содержащего i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие а) 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; b) 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; c) 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; d) 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 e) 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; ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и B) AZD6738 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом.

[0297] В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, подлежащий лечению рак представляет собой рак, описанный в данном документе. В некоторых аспектах рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточного и/или аденокарциномы), рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого. В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника. В некоторых аспектах способа лечения рака молочной железы рак молочной железы представляет собой положительный по гормональным рецепторам (HR+) рак молочной железы, положительный по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (HER2+) рак молочной железы или трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых аспектах рак молочной железы представляет собой TNBC.

[0298] В некоторых аспектах рак представляет собой рак с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD). В некоторых аспектах рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRD, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD выбран из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD представляет собой *BRCA1*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD представляет собой *BRCA2*. В некоторых аспектах мутантный ген HRD представляет собой *ATM*.

[0299] В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC может содержать любые антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC может содержать любой линкер, описанный в данном документе. В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC может содержать любое цитотоксическое средство, описанное в данном документе.

[0300] В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, конъюгированные с SG3932, SG4010, SG4057, SG4052 или их комбинациями. В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC содержит

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, конъюгированные с SG3932. Молекулы линкер-цитотоксическое средство SG3932, SG4010, SG4057 и SG4052 описаны в других частях данного документа.

Наборы

[0301] В одном аспекте предусмотрен набор, содержащий ADC, описанный в данном документе, и ингибитор PARP1, описанный в данном документе. В одном аспекте предусмотрен набор, содержащий ADC, описанный в данном документе, и ингибитор ATR, описанный в данном документе. Дополнительно охватывается применение указанного набора в способах по настоящему изобретению.

[0302] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий А) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие а) 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; b) 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; c) 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; d) 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 e) 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; ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и В) AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0303] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий А) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом В7-Н4, содержащие а) 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; b) 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; c) 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; d) 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 e) 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; ii. расщепляемый линкер; и iii. цитотоксическое средство; и B) AZD6738 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0304] В некоторых аспектах наборов, предусмотренных в данном документе, ADC может содержать любые антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC может содержать любой линкер, описанный в данном документе. В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC может содержать любое цитотоксическое средство, описанное в данном документе.

[0305] В некоторых аспектах наборов, предусмотренных в данном документе, ADC содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, конъюгированные с SG3932, SG4010, SG4057, SG4052 или их комбинациями. В некоторых аспектах комбинаций, предусмотренных в данном документе, ADC содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, конъюгированные с SG3932. Молекулы линкер-цитотоксическое средство SG3932, SG4010, SG4057 и SG4052 описаны в других частях данного документа.

[0306] В некоторых аспектах набор содержит выделенный (например, очищенный) антиген или связывающий фрагмент антитела, описанный в данном документе. В некоторых аспектах набор содержит выделенный (например, очищенный) ADC, описанный в данном документе. В некоторых аспектах набор содержит один или несколько контейнеров. В наборе могут предусматриваться антиген или связывающий фрагмент антитела и линкер и/или цитотоксическое средство по отдельности (например,

средство не конъюгировано с антигеном или связывающим фрагментом антитела, но находится в форме, подходящей для конъюгации с ним); где необязательно в наборе дополнительно предусмотрены инструкции и/или реагенты для конъюгирования средства с антигеном или связывающим фрагментом антитела. В некоторых аспектах набор содержит все из компонентов, необходимых и/или достаточных для введения комбинации ADC и ингибитора PARP1 субъекту. В некоторых аспектах набор содержит все из инструкций, необходимых и/или достаточных для введения комбинации ADC и ингибитора PARP1 субъекту.

ПРИМЕРЫ

[0307] Комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, теперь будет дополнительно пояснена со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Пример 1. Анализ цитотоксичности с использованием клеток DLD-1-BRCA WT, сконструированных для экспрессии B7-H4

[0308] Для определения эффективности комбинированной терапии с помощью ADC B7-H4-TOP1i (E02-GL-SG3932) и селективного ингибитора PARP1 (AZD5305) для уничтожения клеток DLD-1-BRCA дикого типа (WT), экспрессирующих B7-H4, проводили анализ цитотоксичности. Клетки DLD-1-BRCA WT (Horizon Discovery), сконструированные для экспрессии B7-H4, высевали в 96-луночные планшеты при плотности посева, составляющей 1000 клеток/луночка, в среде RPMI, содержащей 10% термоинактивированной FBS. На следующий день клетки обрабатывали возрастающими концентрациями E02-GL-SG3932, совпадающего по изотипу контрольного ADC (0,003052-200 нМ) или AZD5305 (0,4-10 мкМ), по отдельности или в комбинации. Клетки инкубировали в течение 7 дней после обработки и измеряли жизнеспособность клеток с применением анализа CellTiter-Glo (Promega), который позволяет количественно определять жизнеспособность клеток на основе количества присутствующего аденозинтрифосфата (АТФ). Результаты показывают, что при каждой из возрастающих концентраций комбинированная обработка с помощью E02-GL-SG3932 и AZD5305 обеспечивала уничтожение большего количества клеток WT, экспрессирующих B7-H4, при большей скорости, чем это обеспечивали другие обработки: E02-GL-SG3932 по отдельности, AZD5305 по отдельности, совпадающий по изотипу контрольный ADC, а также совпадающий по изотипу контрольный ADC и AZD5305 (фигура 1).

[0309] Для оценки эффекта комбинации двух лекарственных средств и фармакологической синергии (балл по Блиссу > 0) или антагонистического (балл по Блиссу < 0) ответа AZD5305 в комбинации с ADC E02-GL-SG3932 применяли модель синергии по Блиссу, определенную с применением программного обеспечения Combenefit

(Cancer Research UK Cambridge Institute). Veroli et al *Bioinformatics*. 2016 Sep 15; 32(18): 2866-2868. Как показано на фигуре 2, увеличение дозировок при комбинированной обработке обеспечивает баллы синергии по Блисссу, превышающие 10 (синий цвет), что указывает на синергию обработки между E02-GL-SG3932 и AZD5305 при увеличении дозировок.

Пример 2. Анализ цитотоксичности с использованием клеток DLD-1-XMAN-BRCA2-/-, сконструированных для экспрессии B7-H4

[0310] Клетки DLD-1-XMAN-BRCA2-/-, сконструированные для экспрессии B7-H4, применяли для оценки эффективности обработки комбинацией E02-GL-SG3932 и AZD5305 при уничтожении клеток-мишеней. В клетках DLD-1-XMAN-BRCA2-/- отсутствует ген BRCA2, который обеспечивает инструкции для создания белка, который действует в качестве супрессора опухоли. Клетки DLD-1-XMAN-BRCA2-/- (Horizon Discovery), сконструированные для экспрессии B7-H4, высевали в 96-луночные планшеты при плотности посева, составляющей 1000 клеток/лунка, в среде RPMI, содержащей 10% термоинактивированной FBS. На следующий день клетки обрабатывали возрастающими концентрациями E02-GL-SG3932, совпадающего по изотипу контрольного ADC (0,0001-6,7 нМ) или AZD5305 (0,04-1 нМ), по отдельности или в комбинации. Клетки инкубировали в течение 7 дней после обработки и измеряли жизнеспособность клеток с применением анализа CellTiter-Glo (Promega). Как видно на фигуре 3, обработка комбинацией с концентрацией 1 нМ обеспечила уничтожение большего количества клеток DLD-1-XMAN-BRCA2-/-, экспрессирующих B7-H4, при большей скорости, чем это обеспечивали другие обработки: E02-GL-SG3932 по отдельности, AZD5305 по отдельности, совпадающий по изотипу контрольный ADC и совпадающий по изотипу контрольный ADC и AZD5305.

[0311] Для оценки эффекта комбинации двух лекарственных средств и фармакологической синергии (балл по Блисссу > 0) или антагонистического (балл по Блисссу < 0) ответа AZD5305 в комбинации с ADC E02-GL-SG3932 применяли модель синергии по Блисссу, определенную с применением программного обеспечения Combenefit (Cancer Research UK Cambridge Institute). Как показано на фигуре 4, дозировки E02-GL-SG3932 (0,02 нМ) в комбинации с AZD5305 (0,04 нМ, 0,2 нМ и 1 нМ) обеспечивали баллы синергии по Блисссу, превышающие 10 (синий), что указывает на синергию обработки между E02-GL-SG3932 и AZD5305.

Пример 3. Анализ цитотоксичности с использованием клеток MX-1, сконструированных для экспрессии B7-H4

[0312] Клетки MX-1, созданные как культура *in vitro* из моделей на основе ксенотрансплантата опухоли MX-1 из ткани карциномы молочной железы, применяли для оценки эффективности обработки комбинацией E02-GL-SG3932 и AZD5305 при уничтожении клеток-мишеней. Клетки MX-1 высевали в 96-луночные планшеты при плотности посева, составляющей 1500 клеток/луночка, в среде DMEM, содержащей 10% термоинактивированной FBS. На следующий день клетки обрабатывали возрастающими концентрациями E02-GL-SG3932, совпадающего по изотипу контрольного ADC (0,001-400 нМ) или AZD5305 (0,2 или 1 нМ), по отдельности или в комбинации. Клетки инкубировали в течение 7 дней после обработки и измеряли жизнеспособность клеток с применением анализа CellTiter-Glo (Promega). На фигуре 5 показана способность обработок комбинацией E02-GL-SG3932 и AZD5305 в концентрациях 0,2 нМ и 1 нМ обеспечивать уничтожение клеток MX-1 в больших количествах, чем другие обработки: E02-GL-SG3932 по отдельности, AZD5305 по отдельности, совпадающий по изотипу контрольный ADC и совпадающий по изотипу контрольный ADC и AZD5305.

[0313] Для оценки эффекта комбинации двух лекарственных средств и фармакологической синергии (балл по Блиссу > 0) или антагонистического (балл по Блиссу < 0) ответа AZD5305 в комбинации с ADC E02-GL-SG3932 применяли модель синергии по Блиссу, определенную с применением программного обеспечения Combenefit (Cancer Research UK Cambridge Institute). На фигуре 6 показано, что дозировки E02-GL-SG3932 (0,128-3,2 нМ и 400 нМ) в комбинации с AZD5305 (1 нМ) обеспечивали баллы синергии по Блиссу, составляющие ≤ 16 и более 10 (синий), что указывает на синергию обработки между E02-GL-SG3932 и AZD5305 в этих комбинациях.

Пример 4. Модели на основе ксенотрансплантата рака молочной железы из MDA-MB-468

[0314] Проводили эксперименты *in vivo* по измерению противоопухолевой эффективности обработки с помощью E02-GL-SG3932 и AZD5305 у мышей, несущих ксенотрансплантаты эстрогеннезависимых видов рака молочной железы человека MDA-MB-468. Клетки MDA-MB-468 вводили путем инъекции по 5×10^6 на мышью в жировую подушку молочной железы самок мышей CB-17 SCID. Введение дозы изотипического ADC, E02-GL-SG3932, AZD5305 или их комбинаций начинали, когда опухоли достигали в среднем 150-200 мм³. Изотипический контрольный ADC и E02-GL-SG3932 вводили в виде одной IV инъекции в хвостовую вену только в день 1, а в исследованиях комбинации за этой инъекцией следовало пероральное введение дозы один раз в сутки AZD5305 в течение 28 дней. Измерения опухоли и веса тела регистрировали дважды в неделю на протяжении всего исследования. Опухоли, измеренные с течением времени у мышей,

получавших обработку средой-носителем (контроль), AZD5305 по отдельности (0,1 мг/кг и 1 мг/кг), совпадающим по изотипу контрольным ADC (0,5 мг/кг), совпадающим по изотипу контрольным ADC и AZD5305 (1 мг/кг) и E02-GL-SG3932 по отдельности (0,1 мг/кг и 1 мг/кг), увеличивались или сохраняли размер, что указывает на то, что эти способы обработки практически не демонстрировали противоопухолевую активность *in vivo* (фигура 7).

[0315] Обработки с помощью E02-GL-SG3932 (0,5 мг/кг) и AZD5305 (0,1 мг/кг), а также E02-GL-SG3932 (0,5 мг/кг) и AZD5305 (1 мг/кг) демонстрировали высокую противоопухолевую активность. Как показано на фигуре 8, обработки комбинацией E02-GL-SG3932 и AZD5305 были эффективны при подавлении роста приблизительно 67% опухолей у мышей. Дальнейший сравнительный анализ эффективности различных обработок комбинациями на мышах представлен на фигуре 9. Средние объемы опухолей у мышей, получавших обработку с помощью E02-GL-SG3932 (0,5 мг/кг) и AZD5305 (0,1 мг/кг), а также E02-GL-SG3932 (0,5 мг/кг) и AZD5305 (1 мг/кг), были значительно меньше, чем средние объемы опухолей при использовании других способов обработки.

Пример 5. Модели на основе ксенотрансплантата рака молочной железы из MDA-MB-468

[0316] Проводили эксперименты *in vivo* по измерению противоопухолевой эффективности обработки с помощью E02-GL-SG3932 и AZD6738 у мышей, несущих ксенотрансплантаты эстрогеннезависимых видов рака молочной железы человека MDA-MB-468. Клетки MDA-MB-468 вводили путем инъекции по 5×10^6 на мышью в жировую подушку молочной железы самок мышей CB-17 SCID. Изотипический контрольный ADC и E02-GL-SG3932 вводили в виде одной IV инъекции в хвостовую вену только в день 1, а в исследованиях комбинации за этой инъекцией следовало пероральное введение дозы два раза в сутки (BID) AZD6738 в течение 14 дней. Измерения опухоли и веса тела регистрировали дважды в неделю на протяжении всего исследования. Опухоли, измеренные с течением времени у мышей, не получавших обработку (контроль), получавших обработку с помощью AZD6738 по отдельности (25 мг/кг), совпадающего по изотипу контрольного ADC (0,5 мг/кг), E02-GL-SG3932 по отдельности (0,5 мг/кг), а также E02-GL-SG3932 (0,5 мг/кг) и AZD6738 (25 мг/кг), показаны на фигуре 10.

[0317] Как показано на фигуре 10, обработки комбинацией E02-GL-SG3932 и AZD6738 были эффективными в дальнейшем подавлении роста опухолей у мышей. Средние объемы опухолей у мышей, получавших обработку с помощью E02-GL-SG3932 (0,5 мг/кг) и AZD6738 (25 мг/кг), были значительно меньше, чем средние объемы опухолей при использовании других способов обработки.

Пример 6. Доклиническая оценка конъюгата направленное на B7-H4 антитело-лекарственное средство, в комбинации с селективным в отношении PARP1 ингибитором

[0318] В данном исследовании оценивали активность E02-GL-SG3932, конъюгата направленное на B7-H4 антитело-лекарственное средство (ADC), несущего полезную нагрузку, представляющую собой новый ингибитор топоизомеразы I (TOP1i), в комбинации с селективным в отношении поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1) ингибитором AZD5305, в доклинических моделях. Выполняли комплексный анализ распространенности B7-H4 и оценку внутриопухолевой гетерогенности в опухолях человека. Добавление селективного в отношении PARP1 ингибитора нового поколения AZD5305 к лечению с помощью E02-GL-SG3932 обеспечивало сенсбилизацию PDX-опухолей, экспрессирующих B7-H4 на низком уровне, в том числе гомологично-профицитные модели, которые представляют собой приобретенные или врожденные механизмы устойчивости к ингибированию PARP. Эти результаты подтверждают возможность применения комбинации ADC к B7H4 и ингибитора PARP даже у субъектов, которые уже получали лечение ингибиторами PARP, и у субъектов, которые устойчивы к лечению ингибиторами PARP.

Материалы и способы

[0319] *Антитела*

[0320] Антитела, обеспечивающее нацеливание на B7-H4 человека, создавали у мышей VelocImmune V2 путем чередования иммунизации клетками SKBR3 и внеклеточным доменом мышинового B7-H4, химически конъюгированным с гемоцианином моллюска из семейства фиссурелловых. Лидерные антитела выбирали на основании специфичности и перекрестной реактивности в отношении B7-H4 человека и яванского макака, и каркасные области антител подвергали обратной мутации к ближайшему зародышевому типу человека.

[0321] *Линии клеток*

[0322] Клетки HT29 и MDA-MB-468 получали из Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Брауншвейг, Германия) и American Type Culture Collection (Роквилл, Мэриленд, США) соответственно и культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Клетки MX-1 получали из Национального института рака (Бетесда, Мэриленд, США) и культивировали в модифицированной по Дульбекко эссенциальной среде/среде F12, содержащей 10% FBS и 2 mM L-глутамина (Thermo Fisher Scientific). Создавали клональную линию клеток HT29, стабильно экспрессирующую B7-H4 человека (HT29-huB7-H4), с применением

лентивирусных векторов экспрессии, полученных с помощью набора pPACK H1 HIV Lentivector Packaging Kit (System Biosciences, Пало-Альто, Калифорния, США), с последующей трансдукцией, селекцией генетицином и выделением с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток путем прямого окрашивания антителом к B7-H4-PE (US Biological, Сейлем, Массачусетс, США). Все линии клеток культивировали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при температуре, составляющей 37°C, аутентифицировали по профилю ДНК с короткими tandemными повторами (IDEXX BioResearch Laboratories, Колумбия, Миссури, США) и признали отрицательными на наличие *Mycoplasma* с помощью полимеразной цепной реакции и набора для анализа выявления MycoSEQ Mycoplasma (Thermo Fisher Scientific).

[0323] *Иммуногистохимический анализ*

[0324] Иммуногистохимическое (ИНС) выявление B7-H4 проводили на фиксированных в формалине, залитых парафином срезах опухоли или ткани толщиной 4 мкм с помощью автоматизированной платформы для окрашивания Leica Bond RX ИНС (Leica Biosystems, Нуслох, Германия). Срезы нормальной и опухолевой ткани человека окрашивали иммуноглобулином G1 (IgG1) мыши к B7-H4 человека (клон ZY0EYT-D11; AstraZeneca, Кембридж, Соединенное Королевство), а срезы опухолевой ткани, полученные из ксенотрансплантатов пациента (PDX), окрашивали кроличьим IgG1 к B7-H4 человека. Оба антитела тщательно проверяли для применения в ИНС с помощью ряда известных экспрессирующих B7-H4 линий клеток, B7-H4-трансфицированных линий клеток (HT29-huB7H4) и тканей опухоли молочной железы человека (MX-1 и MDA-MB-468) для гарантии специфичности и чувствительности (таблица 1). В качестве отрицательного контроля применяли B7-H4-негативные клетки HT29. Для ортогонального анализа экспрессии B7-H4 посредством ИНС из тех же клеток получали фиксированные в формалине и залитые парафином клеточные осадки. После покрытия покровным стеклом и закрепления предметные стекла сканировали на сканере предметных стекол Leica Aperio Scanscope AT2, а затем их просматривал и оценивал патологоанатом. Связывающую способность антител, меру плотности рецепторов B7-H4, измеряли посредством количественной проточной цитометрии с помощью набора Quantum Simply Cellular от Bangs Laboratories (Фишер, Индиана, США).

Таблица 1. Экспрессия B7H4 в разных типах клеток

Линия клеток	Плотность рецепторов B7-H4	Экспрессия B7-H4, определяемая посредством
		ИНС

MX-1	903,249	+++
HT29-huB7H4	538,257	+++
OvCAR4	357,257	+++
OAW28	353,432	++
SKBR3	292,103	++
MDA-MB-468	170,669	+ / ++
HCC1569	46,557	+ / ++
HT29	101	–

[0325] *Получение ADC*

[0326] Различные поражающие элементы TOP1i были ковалентно связаны с нативными цистеинами в антителе через пептидный линкер val-ala (VA) или Gly-Gly-Phe-Gly (GGFG) с или без спейсера PEG₈, что обеспечило получение четырех отдельных ADC с примерным соотношением лекарственного средства и антитела (DAR), равным 8: SG3932, SG4057, SG4010 и SG4052. Получение этих ADC также описано в WO 2022053650, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Не обеспечивающий нацеливание изотипический контрольный ADC (изо-ADC) синтезировали таким же образом, применяя совпадающее по изотипу антитело с сопоставимым значением DAR. Конъюгат антитело-лекарственное средство E02-GL-SG3932 представляет собой антитело E02-GL, конъюгированное с поражающим элементом SG3932.

[0327] К антителу E02-GL (3,6 г, 24,0 микромоляр) в буфере для восстановления, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту, добавляли 100 мМ раствор TCEP [трис(2-карбокsetил)фосфин] в PBS (12,5 молярного эквивалента/антитело, 0,3 ммоль) при конечной концентрации антитела, составляющей 10 мг/мл. Смесь для восстановления нагревали при 37°C в течение 2 часов (или до полного восстановления, определяемого посредством сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии [UPLC]) в орбитальном встряхивателе при осторожном встряхивании (60 оборотов в минуту). Восстановленное антитело вынимали из инкубатора и обеспечивали его охлаждение до комнатной температуры. В эту смесь добавляли линкер с полезной нагрузкой SG3932, SG4057, SG4010 или SG4052 в виде раствора в диметилсульфоксиде (DMSO) (11-14 молярных эквивалентов/антитело, 26,4-33,6 микромоляр) до конечной концентрации DMSO 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 1 часа при 25°C, а затем конъюгацию гасили *N*-ацетилцистеином (5-кратный избыток по сравнению с полезной нагрузкой в виде 100 мМ исходного раствора). Избыток свободного лекарственного средства удаляли с помощью установки для тангенциальной

проточной фильтрации с применением фильтра mPES, MidiKros 30 кДа с площадью поверхности 375 см², в буфер, содержащий 30 мМ гистидин, 30 мМ аргинин, pH 6,8. Степень удаления свободного лекарственного средства отслеживали посредством UPLC-RP с чистым конъюгатом. После полного удаления свободного лекарственного средства (11-16 DV) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) составляли в 20 мМ гистидине, 240 мМ сахарозе, pH 6,0 (5 DV), и полученный ADC фильтровали с помощью 0,22-мкм фильтра в стерильной атмосфере. Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) рассчитывали посредством UPLC-RP с восстановленным конъюгатом, а мономерную чистоту измеряли посредством UPLC-экслюзионной хроматографии (SEC) с чистым конъюгатом.

[0328] *Исследования эффективности in vivo*

[0329] Все эксперименты с участием животных проводили в учреждении, аккредитованном Ассоциацией по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных, под руководством Институционального комитета по содержанию и использованию животных компании AstraZeneca и при наличии соответствующих разрешений на исследования на животных. Модели с ксенотрансплантатами линий клеток создавали путем подкожной имплантации клеток в 50% Matrigel (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США) в жировую подушку правой молочной железы (MX-1, MDA-MB-468) или в левый бок (HT29, HT29-huB7-H4) самок мышей CB-17 (Envigo, Фредерик, Мэриленд, США). Когда объем опухоли достигал 150-200 мм³, мышей рандомизировали и вводили им однократную внутривенную (IV) инъекцию среды-носителя (20 мМ гистидин, pH 6; 240 мМ сахароза; 0,02% PS-80) или ADC. Вес тела и измерения опухоли определяли один или два раза в неделю, а объем опухоли рассчитывали по формуле:

[0330]
$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{[\text{длина (мм)} \times \text{ширина (мм)}^2]}{2}$$

[0331] PDX-модели TNBC человека создавали путем подкожной имплантации фрагментов опухоли в бок бестимусных "голых" мышей (Envigo, Рьом, Франция) и тестировали в Xentech (Эври, Франция). Животных подбирали по объему опухоли, а затем вводили им контроль в виде среды-носителя или ADC в виде однократной IV инъекции. При применении селективного в отношении PARP1 ингибитора AZD5305 (AstraZeneca) его составляли в смеси вода/HCl, pH 3,5-4, и вводили с помощью желудочного зонда в объеме конечной дозы, составляющем 10 мл/кг, один раз в сутки в течение 28 дней. Противоопухолевую активность определяли в последний день, в это время все мыши из контрольной группы, не подвергавшейся обработке, оставались в исследовании. Если конечный объем опухоли (ETV) в группе с обработкой был меньше начального объема

опухоли (ITV), противоопухолевый ответ по сравнению с исходным уровнем рассчитывали по средним значениям группы с применением формулы:

$$[0332] \quad \left[\frac{(ETV - ITV)}{ITV} \right] \times 100.$$

[0333] В противном случае противоопухолевый ответ выражали как процентное изменение объема опухоли в группе с обработкой по сравнению с контрольной группой, не подвергавшейся обработке, и рассчитывали по формуле:

$$[0334] \quad 100 - \left\{ 1 - \left[\frac{(ETV - ITV)_{\text{с обработкой}}}{(ETV - ITV)_{\text{без обработки}}} \right] \times 100 \right\}.$$

[0335] Для фармакодинамических и фармакокинетических исследований мышам, несущим либо опухоли HT29, либо опухоли HT29-huB7-H4 (250-300 мм³), вводили однократную IV инъекцию контроля в виде среды-носителя или ADC. Образцы плазмы крови и опухоли собирали в указанные моменты времени, после чего одну часть опухоли фиксировали в формалине и заливали в парафиновые блоки для анализа ИHC, а оставшуюся часть быстро замораживали для анализа общего содержания моноклональных антител, ADC и свободного поражающего элемента посредством жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

[0336] *Статистический анализ*

[0337] Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение или среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Для оценки ассоциаций между ответом и отсутствием ответа в PDX-моделях выполняли тест Вилкоксона для сравнения групп в среде статистического программирования R (версия 4.1). $P < 0,05$ считали статистически значимым.

[0338] Экспрессия и распространенность B7-H4 в опухолевых тканях

[0339] B7-H4 экспрессировался в нескольких типах опухолей и был наиболее распространен в карциноме эндометрия (94%), холангиокарциноме (89%), раке молочной железы (HER2⁺ 78%, TNBC 74%, ER⁺ 74%) и карциноме яичника (77%) (фигуры 11A, 11B). В отличие от этого, B7-H4 выявляли в ограниченном числе нормальных тканей человека, таких как фаллопиева труба, легкое, молочная железа и предстательная железа, и он обычно находился в $< 10\%$ от общего количества клеток в образце, ограничивался дуктальным или трубчатым эпителием и в основном локализовался на апикальной люминальной мембране (таблица 2).

[0340] Чтобы понять внутриопухолевую гетерогенность B7-H4 в отдельных опухолях, что представляет собой ключевой фактор, влияющий на активность ADC, отдельную коллекцию гистологически аннотированных образцов TNBC ($n = 196$) окрашивали и подвергали цифровому анализу с помощью алгоритмов анализа

изображений на основе глубокого обучения для выявления и сегментации отдельных эпителиальных клеток опухоли и количественной оценки уровня экспрессии V7-N4 на мембране каждой клетки. Такой подход позволил изучить распределение экспрессии V7-N4 в расчете на одну клетку, показав диапазон гетерогенной экспрессии V7-N4 в каждом образце пациентов из всей когорты (фигура 11С). Уровень экспрессии V7-N4 и гетерогенность экспрессии слабо коррелировали ($r = -0,84, P < 0,01$).

Таблица 2. Экспрессия V7-N4 в нормальной ткани человека

Ткань^а	Количество доноров с ИНС окрашиванием V7-N4/общее количество во	Относительная доля ткани с V7-N4⁺ окрашиванием	Интенсивность	Клеточная локализация	Подробности
Молочная железа	6/6	< 10%	+ / +++	Люминальная m	Эпителиальные клетки протоков
Придаток яичка	3/3	< 5%	++	Люминальная m	Люминальная мембрана в протоках
Фаллопиева труба	3/3	< 30%	++ / +++	Люминальная m	Окрашивание эпителия протоков
Почка	11/11	< 5%	++ / +++	Люминальная m > c	Окрашивание люминальной мембраны и в некоторой степени цитоплазмы в единичных канальцах

Ткань ^a	Количество доноров с ИНС окрашиванием В7-Н4/общее количество	Относительная доля ткани с В7-Н4 ⁺ окрашиванием	Интенсивность	Клеточная локализация	Подробности
Печень	2/3	1%	+ / ++	Люминальная т	Люминальная мембрана единичных небольших желчных протоков
Легкое- бронхи	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 ^a	Количество доноров с ИНС окрашиванием В7-Н4/общее количество	Относительная доля ткани с В7-Н4 ⁺ окрашиванием	Интенсивность	Клеточная локализация	Подробности
Яичник	3/6	1%	+ / + + +	с > m	Отдельный зрелый ооцит, демонстрирующий наличие зернистых клеток
Поджелудочная железа	8/8	< 5%	+ / + + + +	Люминальная m	Люминальная мембрана и цитоплазма centroacinarных клеток и окрашивание люминальной мембраны вставочных протоков

Ткань ^a	Количество доноров с ИНС окрашиванием В7-Н4/общее количество во	Относительная доля ткани с В7-Н4 ⁺ окрашиванием	Интенсивность	Клеточная локализация	Подробности
Гипофиз	3/3	< 5%	++/+++	m > c	Единичные локализованные клетки в пределах клеток промежуточной доли гипофиза демонстрируют окрашивание коллоидного вещества в фолликулах и эпителиальных клеток кармана Ратке
Предстательная железа	3/3	< 10%	++/+++	m > c	Базальные эпителиальные клетки в некоторых протоках
Семенная железа	3/3	< 10%	++/+++	Люминальная m	Несколько дуктулярных эпителиальных клеток

Ткань ^a	Количество доноров с ИНС окрашиванием В7-Н4/общее количество во	Относительная доля ткани с В7-Н4 ⁺ окрашиванием	Интенсивность	Клеточная локализация	Подробности
Кожа	15/16	< 5%	++/+++	Люминальная т	Мембрана единичных эпителиальных клеток протоков потовых желез, мембрана эпителиальных клеток волосяного фолликула
Мочеточник	3/3	< 5%	+ / ++	т > с	Окрашивание цитоплазмы в некоторых базальных уротелиальных клетках
Мочевой пузырь	8/8	< 10%	++/+++	Люминальная т > с	Апикальная сторона уротелиальных клеток

Комбинация E02-GL-SG3932 с селективным в отношении PARP1 ингибитором AZD5305 следующего поколения

[0341] PARP1 ограничивает цитотоксичность TOP1i, усиливая вырезание и репарацию, осуществляемые комплексами расщепления TOP1. Поэтому E02-GL-SG3932 тестировали в комбинации с селективным в отношении PARP1 ингибитором AZD5305 следующего поколения на коллекции PDX-моделей с профицитом гомологичной

рекомбинации (HRP), включая опухоли с BRCA WT и модели, представляющие механизмы пост-PARP устойчивости. В модели BRCA WT HBCx-39, экспрессирующей B7-H4 на высоком уровне, AZD5305 обеспечивал сенсibilизацию опухоли к однократной субоптимальной дозе 1,25 мг/кг E02-GL-SG3932, что привело к регрессии опухоли у пяти из пяти мышей, в отличие от 24,5% TGI, наблюдавшихся в группе, получавшей монотерапию с помощью E02-GL-SG3932 (фигура 12A). Более высокую активность комбинированного лечения также наблюдали при использовании более высокой дозы (3,5 мг/кг) E02-GL-SG3932, что увеличивало продолжительность ответа по сравнению с монотерапией с помощью E02-GL-SG3932 (фигура 12B). Сходные результаты получали и в других моделях, экспрессирующих B7-H4 на высоком уровне, включая *BRCA1*-мутантную модель HBCx-24 (фигура 12C), где устойчивость к PARPi, вероятно, обусловлена метилированием промотора BRCA1, и модель HBCx-11 (фигура 12D), которая является гипоморфной по BRCA1 и устойчивой к PARPi. Преимущество комбинации, наблюдаемое в HBCx-39 и HBCx-11, вызывает интерес, поскольку эти модели не только представляют BRCA WT (HBCx-39) или являются устойчивыми к PARPi (HBCx-11), но также являются SLFN11-отрицательными. Поскольку потеря SLFN11 является предполагаемым биомаркером устойчивости как к TOP1i, так и к PARPi, высокая активность комбинации, наблюдаемая в этих моделях, является неожиданной. Также было неожиданным то, что преимущество комбинации распространялось на HBCx-8, которая характеризуется очень низким уровнем экспрессии B7-H4 и представляет собой BRCA1-мутантную модель HRP, устойчивую к PARPi (фигура 12E). В этой модели однократная доза, составляющая 1,25 мг/кг, E02-GL-SG3932 обеспечивала умеренную противоопухолевую активность (32,9% TGI), тогда как комбинация с AZD5305 обеспечивала регрессию опухоли у пяти из пяти мышей. Сходное преимущество комбинации наблюдали в модели с BRCA WT с низким уровнем экспрессии B7-H4, представляющей собой HBCx-2 (фигура 12F), поскольку улучшение активности наблюдали при увеличении доз ADC.

[0342] Фармакологическое ингибирование пути ответа на повреждение ДНК является привлекательным подходом для максимизации ответа на TOP1i-ADC и обеспечения большей противоопухолевой активности. В этом исследовании оценивали комбинацию E02-GL-SG3932 и AZD5305, действенного селективного ингибитора PARP1, демонстрирующего снижение гематологической токсичности в доклинических моделях по сравнению с неселективным PARPi. Комбинация E02-GL-SG3932 и AZD5305 обеспечивала большую противоопухолевую активность, чем монотерапия, что приводило к большей регрессии опухоли или улучшению продолжительности ответа даже в моделях

с низким уровнем экспрессии В7-Н4. Такое преимущество комбинации наблюдали с низкими, субоптимальными дозами E02-GL-SG3932, а также в моделях HRP BRCA1 WT или BRCA1-мутантных моделях HRP, представляющих механизмы устойчивости к PARPi. Эти результаты позволяют предположить, что эта комбинация может быть эффективной в условиях устойчивости к PARPi, и что не обязательно достигать максимальной активности ADC, чтобы извлечь пользу из этого механизма.

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: EINHSGSTSYNPSLKS
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
 YNPSLKSRTVILVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNLYNWNLDSWGQGLTVTVS
 S

SEQ ID NO: 32 (ZY0EPQ-E02, переменная область легкой цепи)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYVASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 33 (ZY0EQD-E02, переменная область тяжелой цепи, например,
 перед модифицированием путем обратной мутации к зародышевому типу)**
 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
 YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVTVS
 S

SEQ ID NO: 34 (ZY0EQD-E02, переменная область легкой цепи)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP
 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 35 (ZY0EOB-F05, переменная область тяжелой цепи)
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSISSGGYYWSWIRQHHPGKGLEWIGNIYYSGS
 TYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCATEKALATVTPSGYENYYTV
 DVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 36 (ZY0EOB-F05, переменная область легкой цепи)
 DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPS
 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 37 (ZY0EO5-E07, переменная область тяжелой цепи)
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISISSGGYYWSWIRQHHPGKGLEWIGNIYYSGSTY
 YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKALASVIPSGYENYYVVDV
 WGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 38 (ZY0EO5-E07, переменная область легкой цепи)
 DIQLTQSPSFLSASVGGRVITTCWASQGIAGYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPS
 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 39: (ZY0EP0-C07, переменная область тяжелой цепи)
 QVQLVESGGVLV^KPGGSLRLSCAASGFTLSDYYMSWIRQAPGMGLEWVSYISSSGSTIY
 YTDSVKGRFTISRDSA^KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGVGFDYWGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 40 (ZY0EP0-C07, переменная область легкой цепи)
 EIVLTQSPGTL^SLFPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQSPRLLIYAASSRATGIPD
 RFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQY^GSSPLYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 41 (константная область тяжелой цепи Maia, вставка цистеина выделена):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^SWNSGALTS^GVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSV^TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV^EPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVY^T
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 42 (константная область легкой цепи)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^VCLLNNFY^PREAKVQWKVDNALQSGNSQESV^T
 EQDSKDYSLSS^TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 43 (ZY0EQD-E02, переменная область тяжелой цепи, например, перед модифицированием путем обратной мутации к зародышевому типу, например, вариант SEQ ID NO: 33/SEQ ID NO: 45)

QVQLQQWGAGLLK^PSETLSLTCTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGRGLEWIGEINHSGSTSY
 NPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 44 (ZY0EQD-E02, легкая цепь):
 DIQMTQSPSSLSASV^GDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGV^P
 SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASV^VCLLNNFY^PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS^T
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 45 (EQD-E02_GL, переменная область тяжелой цепи, GL = полученная путем обратной мутации к зародышевому типу)

QVQLQQWGAGLLK^PSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST
 SYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLLVTV
 SS

SEQ ID NO: 46 (EQD-E02-GLY, переменная область тяжелой цепи, GLY = полученная путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Y)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGST
SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVT
SS

SEQ ID NO: 47 (EQD-E02-GLQ, вариабельная область тяжелой цепи, GLQ = полученные путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Q)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGS
TSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVT
VSS

SEQ ID NO: 48 (E02-GL-Maia-тяжелая цепь, вставка цистеина выделена)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST
SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGQNFVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49 (E02-GLY-Maia-тяжелая цепь, GLY = полученные путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Y)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGST
SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGQNFVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50 (E02-GLQ-Maia-тяжелая цепь, GLQ = полученные путем обратной мутации к зародышевому типу с заменой Q)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGS
TSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
LGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51 (E02-GL-WT-тяжелая цепь)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST
SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52 (константная область тяжелой цепи)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 53 (последовательность нуклеиновой кислоты В7Н4 человека, включающая 5' и 3' UTR)

GCCACCatggctccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattgg
ctttggatttcaggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttga
cctgacatcaaaccttctgatcctgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaagaaggcaaatgagctgt
cggagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtggttctgatcaagtatagttggcaatgcctcttgcggctgaaaaacgtgcaa
ctcacagatgctggcacctacaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgc
cggaaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttccccagcccacagtggtctgggcatc
ccaagttgaccaggagccaacttctcggaagtctccaataaccagcttggagctgaactctgagaatgtgacctgaaggttgtctgtgct
ctacaatgttacgatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatataaagtacagaatcggagat
caaaaggcggagtcactacagctgctaaactcaaggcttctctgtgtctcttcttcttccatcagctgggcacttctgcctctcagcc
cttacctgatgctaaaaTAATAA

SEQ ID NO: 54 (последовательность нуклеиновой кислоты В7Н4 человека, кодирующая последовательность)

atggctccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctttgtattt
caggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacctgacatc
aaacttctgatcctgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaagaaggcaaatgagctgtcggagcag

gatgaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctcttgcggctgaaaaacgtgcaactcacagat
gctggcacctacaaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgtaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtg
aatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttccccagcccacagtggctctgggcatccaagtga
ccaggagccaacttctcgggaagtctccaataaccagcttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtctgtctctacaatgt
acgatcaacaacacatactctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatataaaagtacagaatcggagatcaaaaggc
ggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtctcttcttcttccatcagctgggcacttctgcctctcagcccttacctgat
gctaaaa

SEQ ID NO: 55 (полипептидная последовательность В7Н4 человека; номер доступа в UniProt: Q7Z7D3)

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKL
SDIVIQWLKEGVLGLVHEFKGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQL
TDAGTYKCYIITSKKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVV
WASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIK
VTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку

A) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

a) 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;

b) 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;

c) 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;

d) 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

e) 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;

ii. расщепляемый линкер;

iii. цитотоксическое средство; и

B) дополнительного средства, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR.

2. Способ по п. 1, где дополнительное средство представляет собой AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п. 1, где дополнительное средство представляет собой AZD6738 или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4.

5. Способ по п. 4, где рак дополнительно предусматривает раковую клетку, которая не экспрессирует B7-H4.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточного и/или аденокарциномы), рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где 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).

8. Способ по любому из пп. 1-7, где рак представляет собой рак с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD).

9. Способ по п. 8, где рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRD, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*.

10. Способ по п. 9, где мутация в гене HRD выбрана из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*.

11. Способ по любому из пп. 1-10, 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. переменную область тяжелой (VH) цепи и переменную область легкой (VL) цепи, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 34 соответственно или их функциональный вариант;

v. переменную область тяжелой (VH) цепи и переменную 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.

12. Способ по любому из пп. 1-11, 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.

13. Способ по любому из пп. 1-12, 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.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают линию клеток OVCAR4.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

16. Способ по любому из пп. 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

17. Способ по любому из пп. 1-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

18. Способ по любому из пп. 1-14, 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.

19. Способ по любому из пп. 1-14, 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.

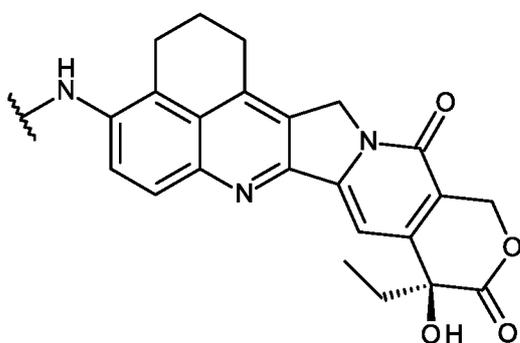
20. Способ по любому из пп. 1-19, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизированное моноклональное антитело.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где расщепляемый линкер представляет собой линкер mp-PEG8-val-ala.

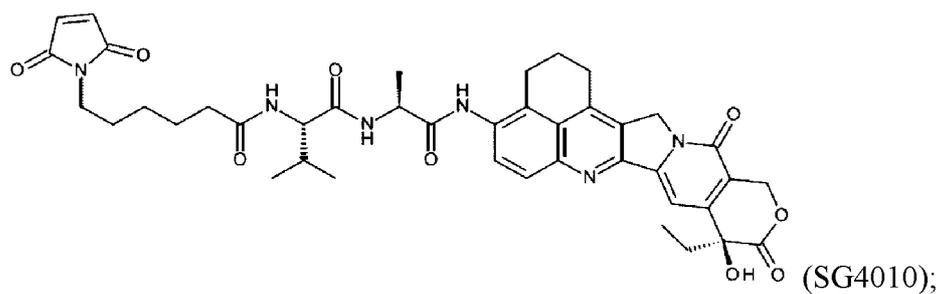
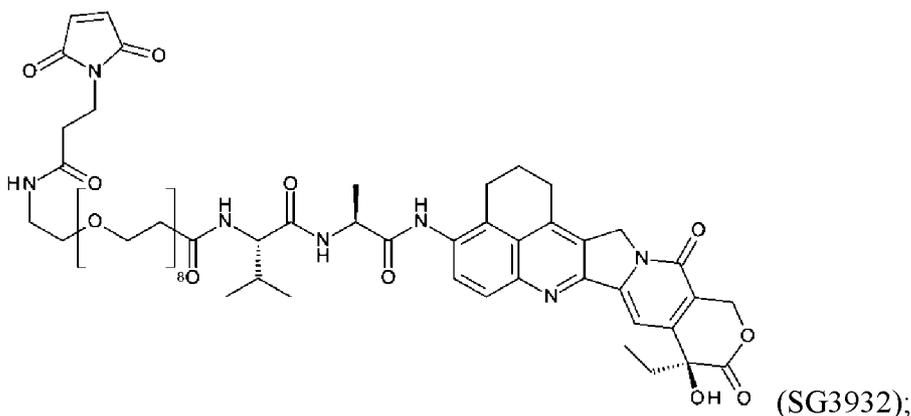
23. Способ по любому из пп. 1-22, где цитотоксическое средство представляет собой ингибитор топоизомеразы.

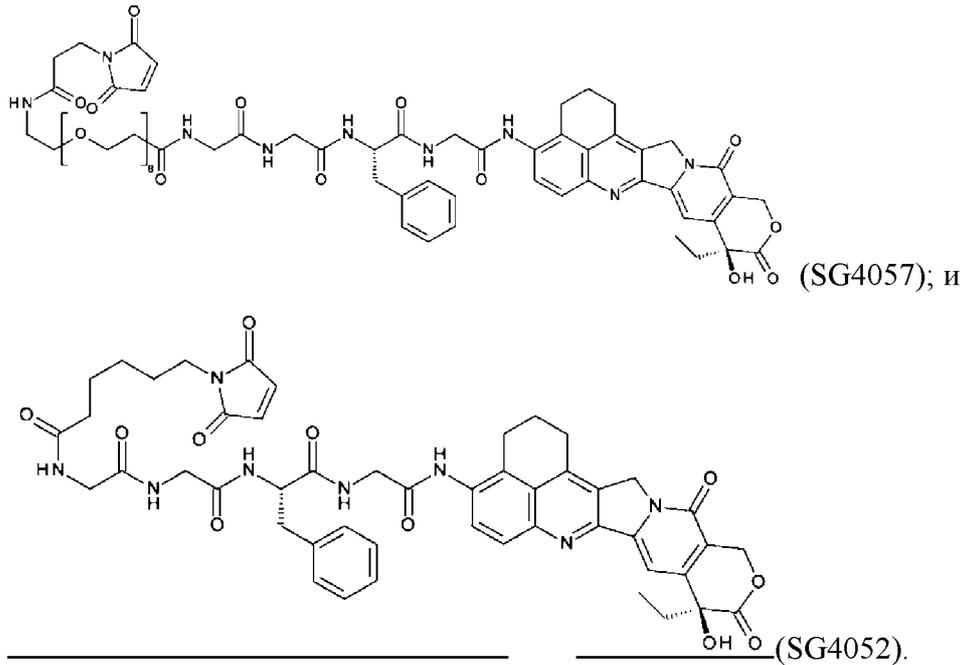
24. Способ по п. 23, где ингибитор топоизомеразы представляет собой соединение формулы A*:



A*

25. Способ по любому из пп. 1-24, где ii) расщепляемый линкер и iii) цитотоксическое средство вместе выбраны из следующих соединений:





26. Способ по п. 25, где ii) линкер и iii) цитотоксическое средство вместе представляют собой соединение SG3932.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где ADC характеризуется соотношением лекарственного средства и антитела (DAR), составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 8.

28. Способ по любому из пп. 1-26, где ADC характеризуется DAR, составляющим приблизительно 8.

29. Набор, содержащий

A) конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

a) 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;

b) 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;

c) 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;

d) 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

e) 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;

ii. расщепляемый линкер;

iii. цитотоксическое средство; и

В) дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой ингибитор PARP1 или ингибитор ATR.

30. Набор по п. 29, где дополнительное средство представляет собой AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль.

31. Набор по п. 29, где дополнительное средство представляет собой AZD6738 или его фармацевтически приемлемую соль.

32. Набор по любому из пп. 29-31, 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.

33. Набор по любому из пп. 29-32, 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.

34. Набор по любому из пп. 29-33, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

35. Набор по любому из пп. 29-33, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

36. Набор по любому из пп. 29-33, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

37. Набор по любому из пп. 29-33, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID

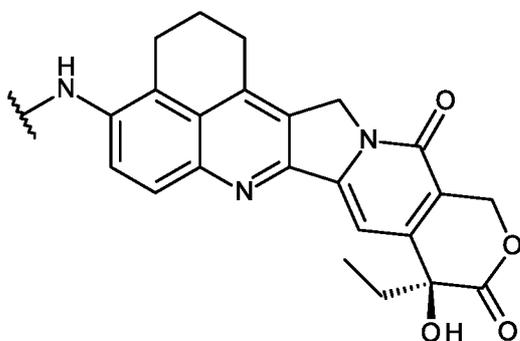
NO: 51; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44.

38. Набор по любому из пп. 29-33, 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.

39. Набор по любому из пп. 29-38, где расщепляемый линкер представляет собой линкер mp-PEG8-val-ala.

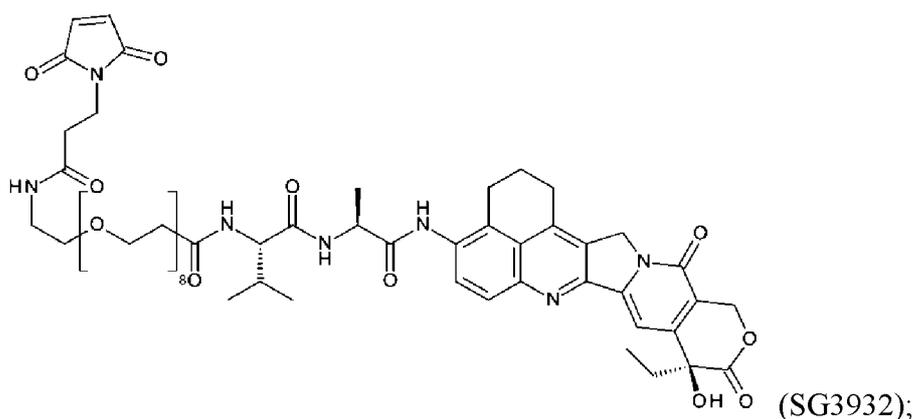
40. Набор по любому из пп. 29-39, где цитотоксическое средство представляет собой ингибитор топоизомеразы.

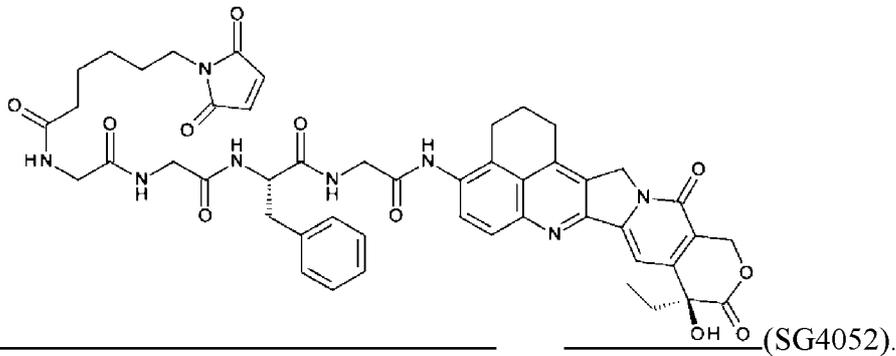
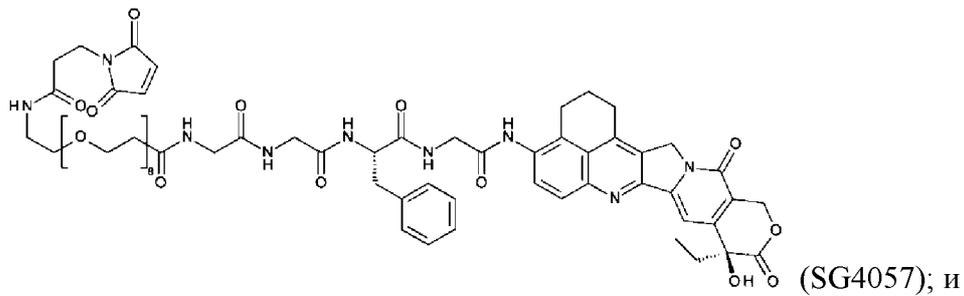
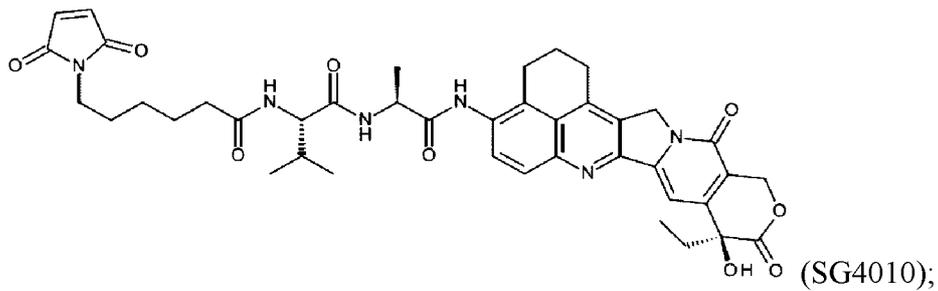
41. Набор по п. 40, где ингибитор топоизомеразы представляет собой соединение формулы A*:



A*

42. Набор по любому из пп. 29-41, где ii) расщепляемый линкер и iii) цитотоксическое средство вместе выбраны из следующих соединений:





43. Набор по п. 42, где ii) линкер и iii) цитотоксическое средство вместе представляют собой соединение SG3932.

44. Набор по любому из пп. 29-43, где ADC характеризуется соотношением лекарственного средства и антитела (DAR), составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 8.

45. Набор по любому из пп. 29-43, где ADC характеризуется DAR, составляющим приблизительно 8.

46. Способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку

A) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

а) 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;

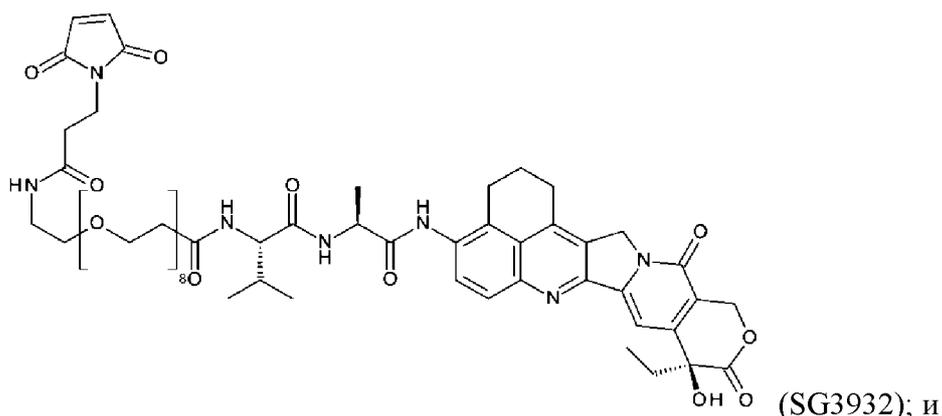
b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;

c) 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;

d) 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

e) 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; и

ii. расщепляемый линкер и цитотоксическое средство, конъюгированные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, характеризующиеся формулой:



B) AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли.

47. Способ лечения рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту-человеку

A) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с полипептидом B7-H4, содержащие

a) 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;

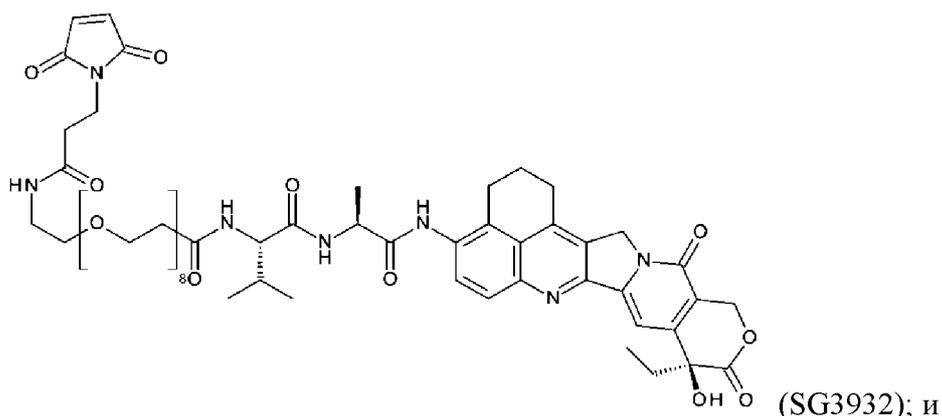
b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно или их функциональный вариант;

c) 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;

d) 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

e) 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; и

ii. расщепляемый линкер и цитотоксическое средство, конъюгированные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, характеризующиеся формулой:



B) AZD6738 или его фармацевтически приемлемой соли.

48. Способ по п. 46 или п. 47, где рак предусматривает раковую клетку, которая экспрессирует B7-H4.

49. Способ по п. 48, где рак дополнительно предусматривает раковую клетку, которая не экспрессирует B7-H4.

50. Способ по любому из пп. 46-49, где рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака эндометрия, холангиокарциномы, NSCLC (плоскоклеточного и/или аденокарциномы), рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого.

51. Способ по любому из пп. 46-50, где рак представляет собой рак молочной железы, выбранный из положительного по гормональным рецепторам (HR+) рака молочной железы,

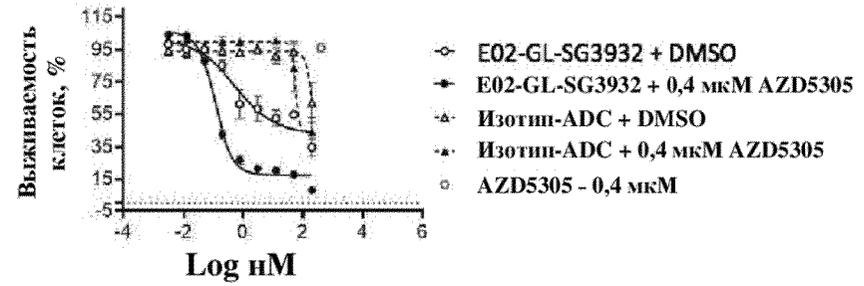
положительного по рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (HER2+) рака молочной железы и трижды негативного рака молочной железы (TNBC).

52. Способ по любому из пп. 46-51, где рак представляет собой рак с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD).

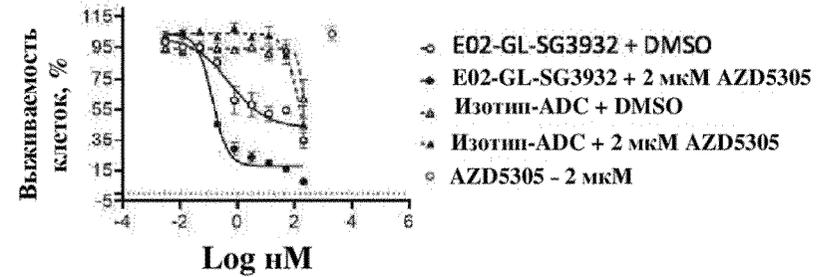
53. Способ по п. 52, где рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRD, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*.

54. Способ по п. 53, где мутация в гене HRD выбрана из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*.

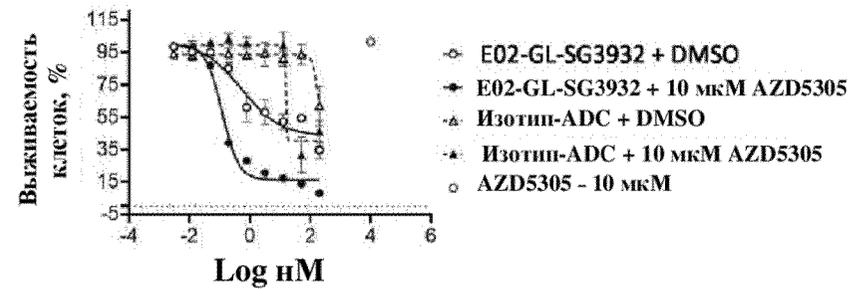
E02-GL-SG3932 + 0,4 мкМ AZD5305



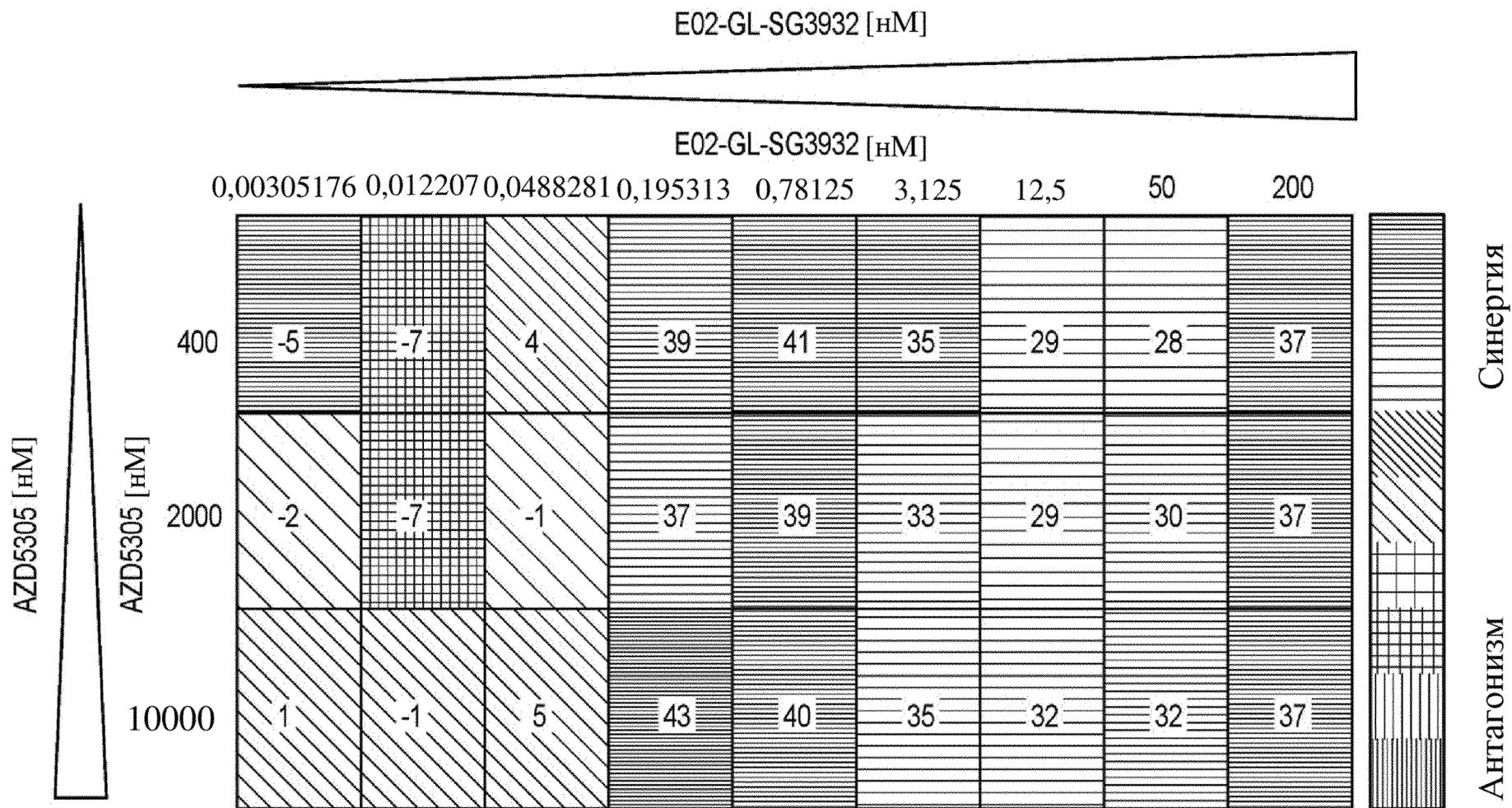
E02-GL-SG3932 + 2 мкМ AZD5305



E02-GL-SG3932 + 10 мкМ AZD5305

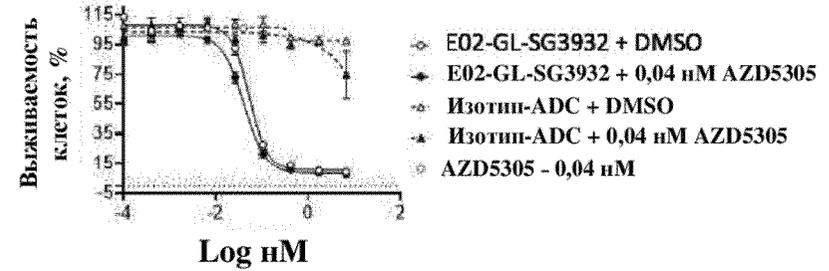


Фигура 1

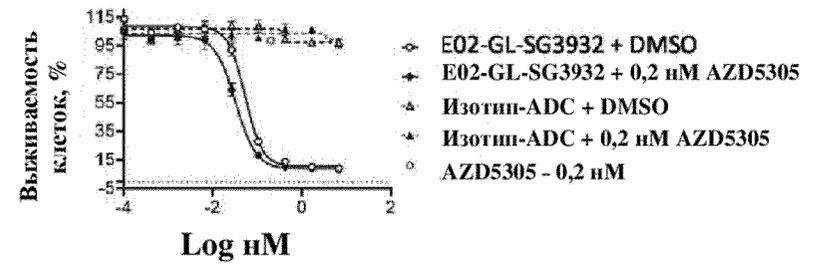


Фигура 2

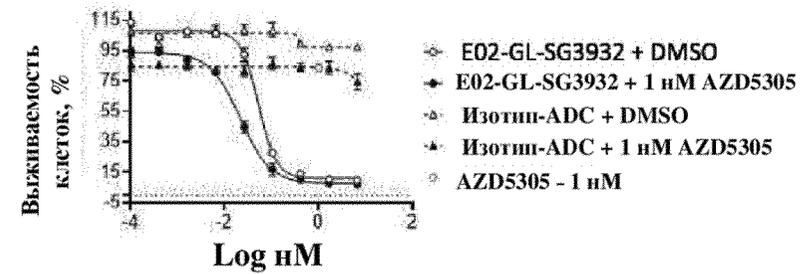
E02-GL-SG3932 + 0,04 нМ AZD5305



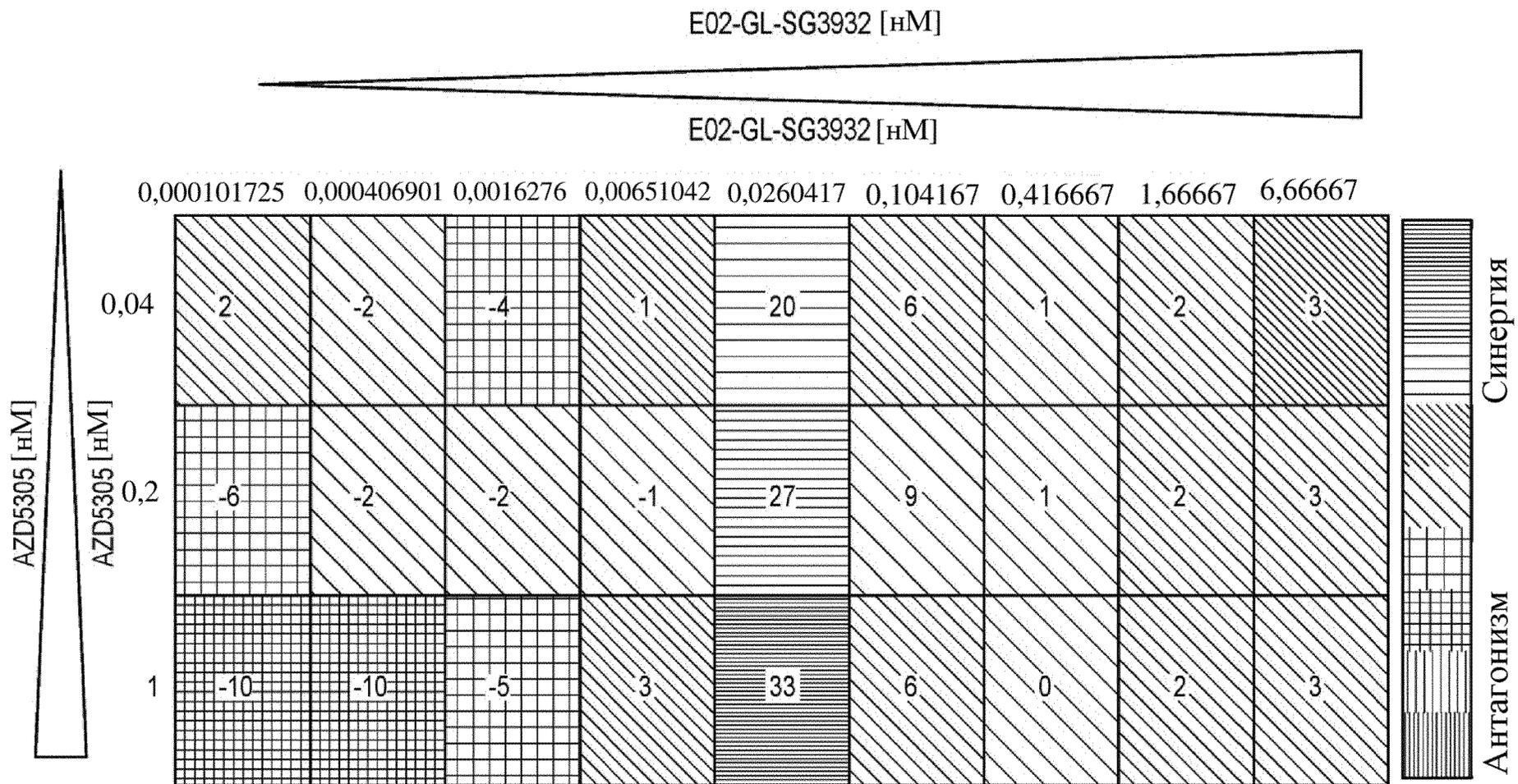
E02-GL-SG3932 + 0,2 нМ AZD5305



E02-GL-SG3932 + 1 нМ AZD5305

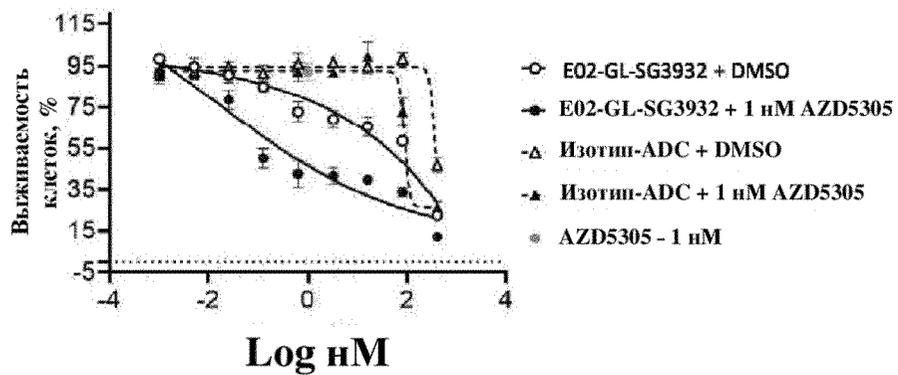


Фигура 3

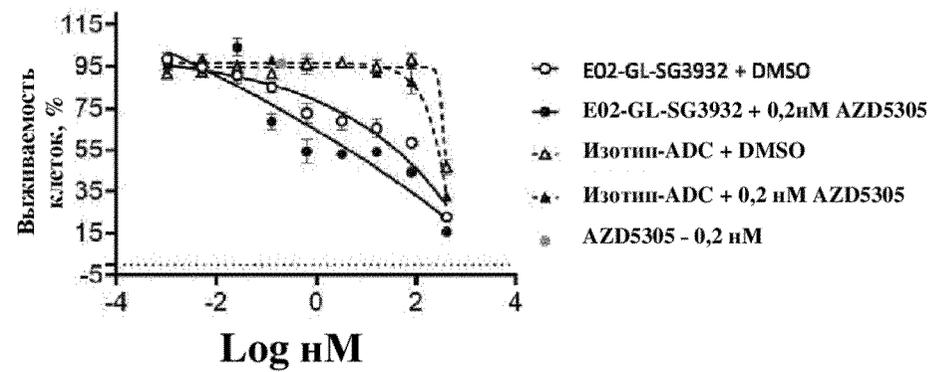


Фигура 4

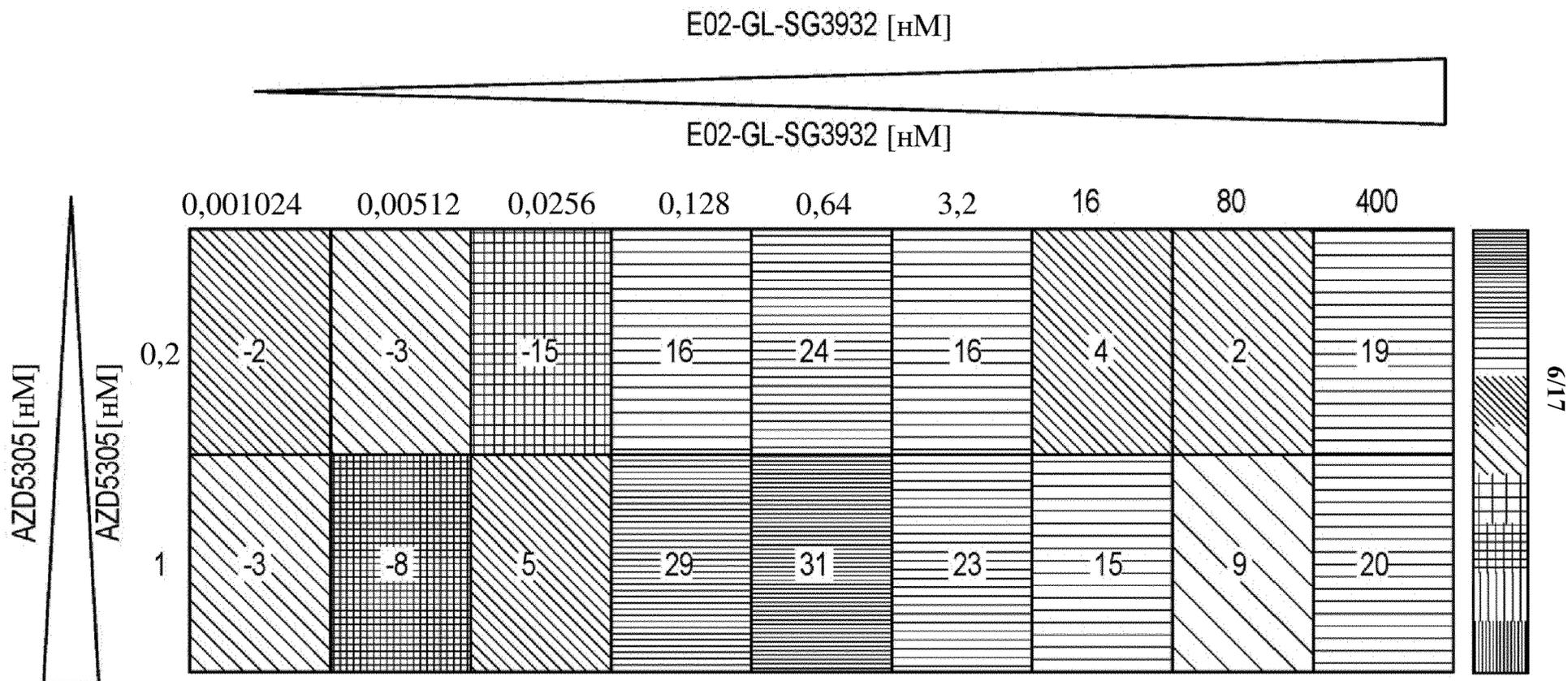
E02-GL-SG3932 + 1 нМ AZD5305



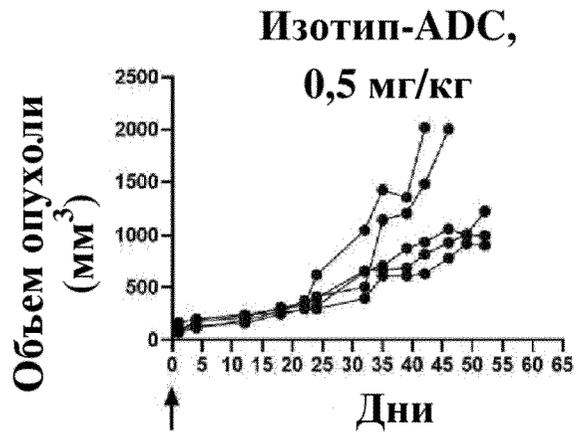
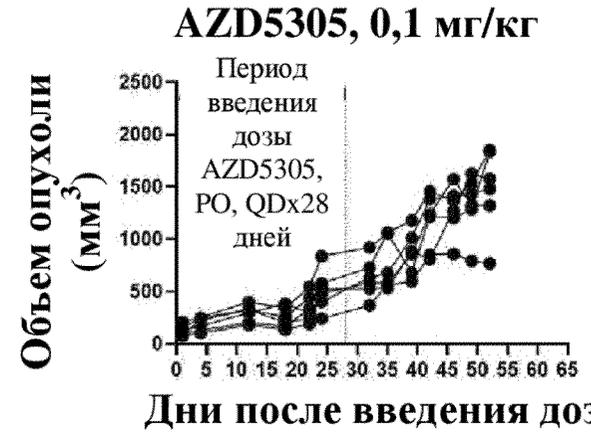
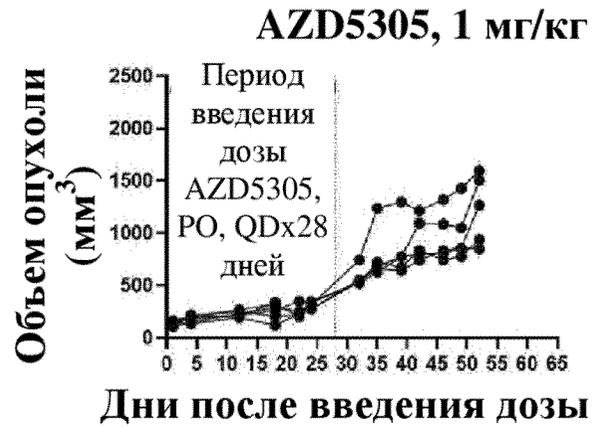
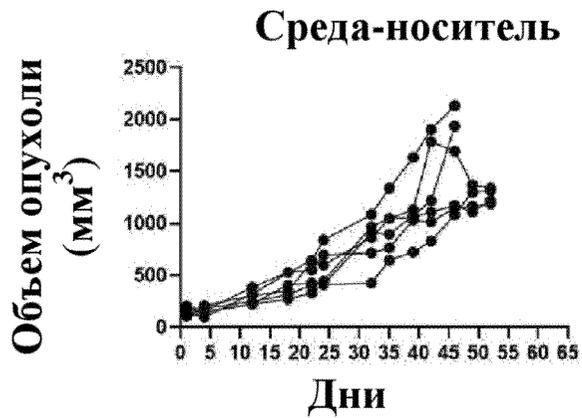
E02-GL-SG3932 + 0,2 нМ AZD5305



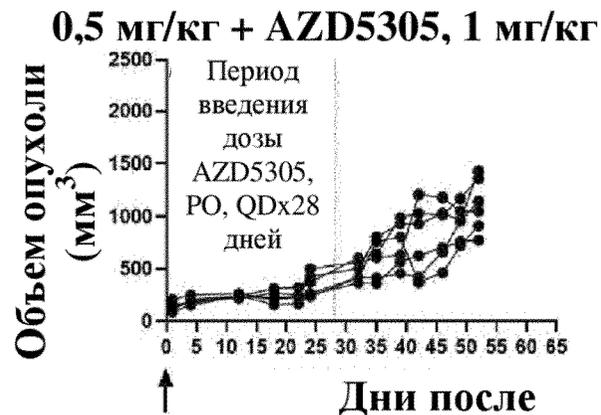
Фигура 5



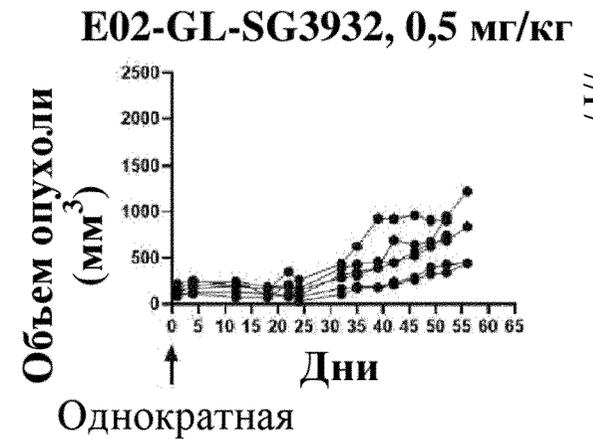
Фигура 6



↑
Однократная доза ADC, I.V.



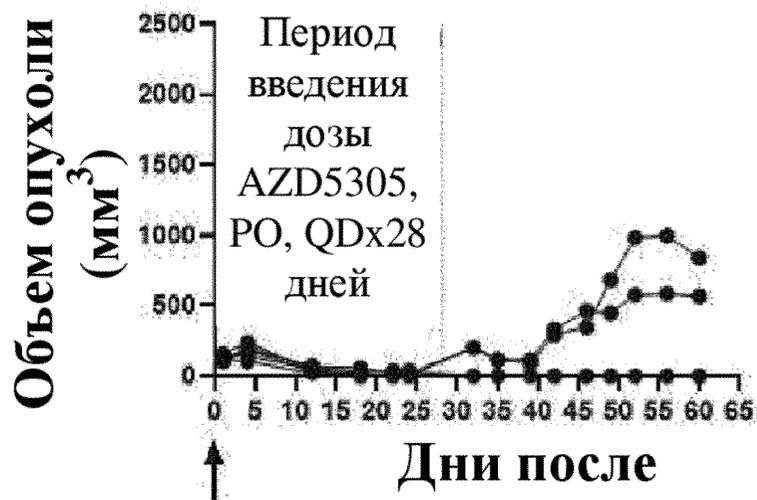
↑
Однократная доза ADC, I.V.



↑
Однократная доза ADC, I.V.

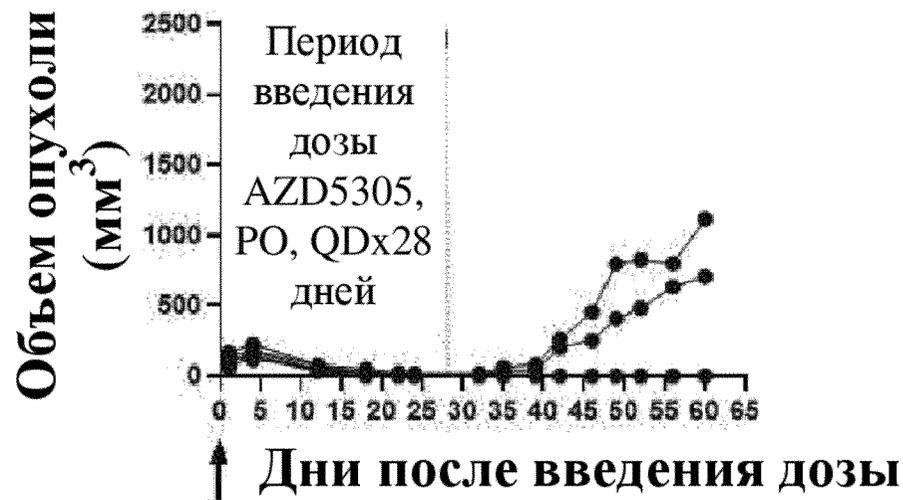
Фигура 7

**E02-GL-SG3932,
0,5 мг/кг + AZD5305, 1 мг/кг**



Однократная доза ADC, I.V. **введения дозы**

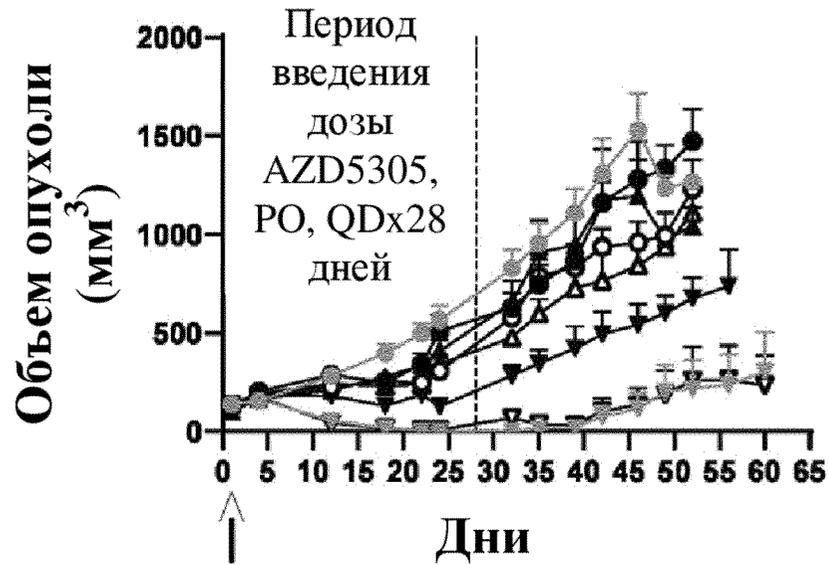
**E02-GL-SG3932,
0,5 мг/кг + AZD5305, 0,1 мг/кг**



Однократная доза ADC, I.V. **Дни после введения дозы**

Фигура 8

MDA-MB-468

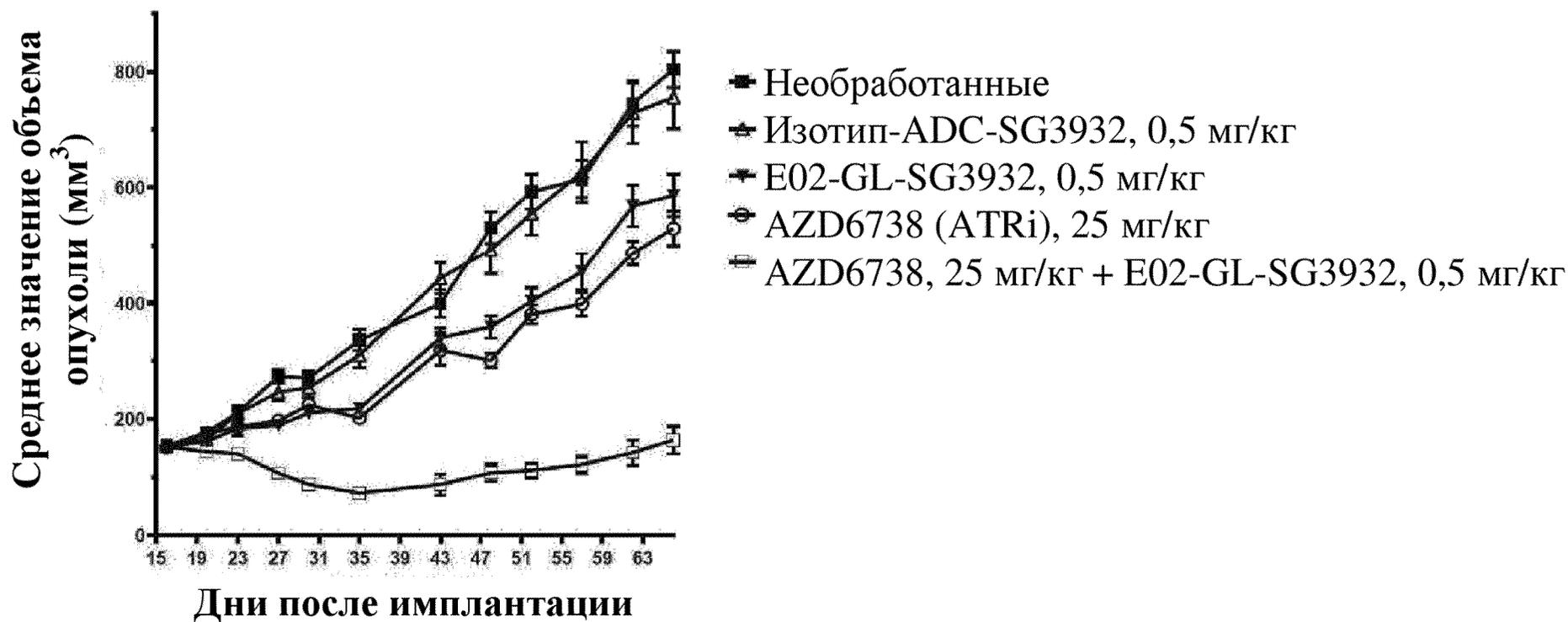


- Среда-носитель
- AZD5305, 0,1 мг/кг
- AZD5305, 1 мг/кг
- ▲ Изотип-ADC, 0,5 мг/кг
- △ Изотип-ADC, 0,5 мг/кг + AZD5305, 1 мг/кг
- ▼ E02-GL-SG3932, 0,5 мг/кг
- ▽ E02-GL-SG3932, 0,5 мг/кг + AZD5305, 0,1 мг/кг
- ▽ E02-GL-SG3932, 0,5 мг/кг + AZD5305, 1 мг/кг

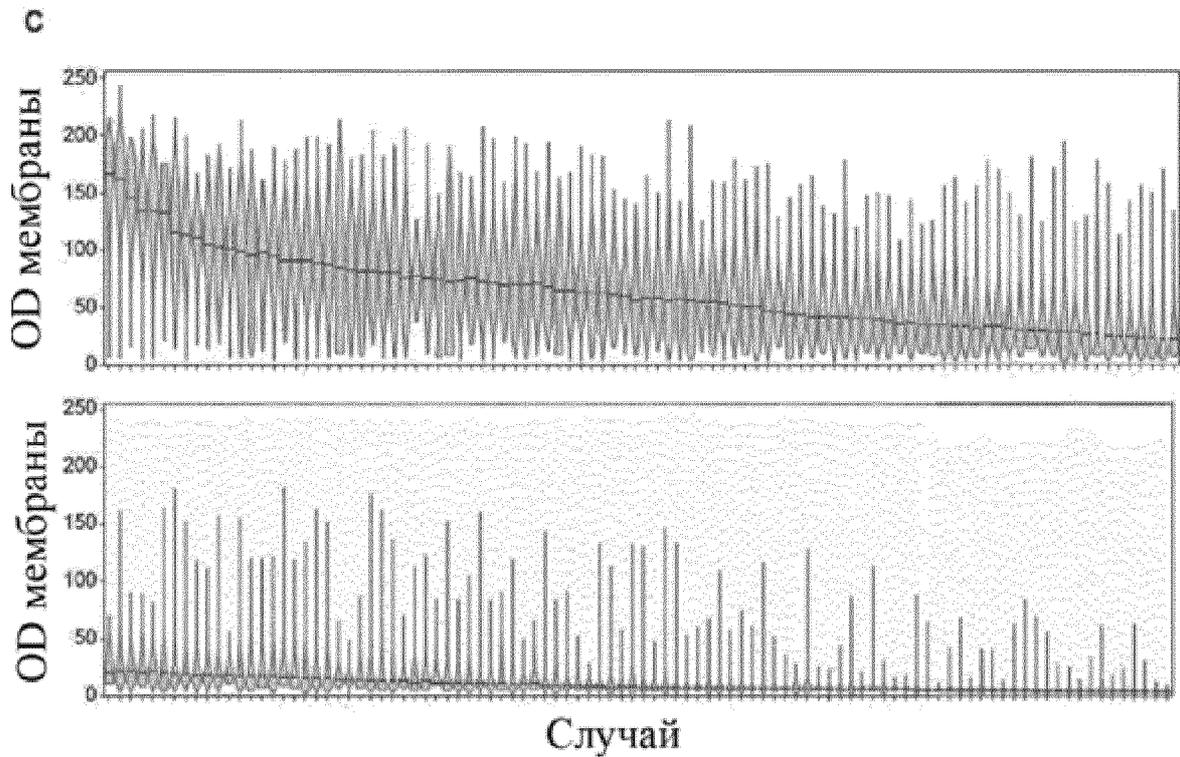
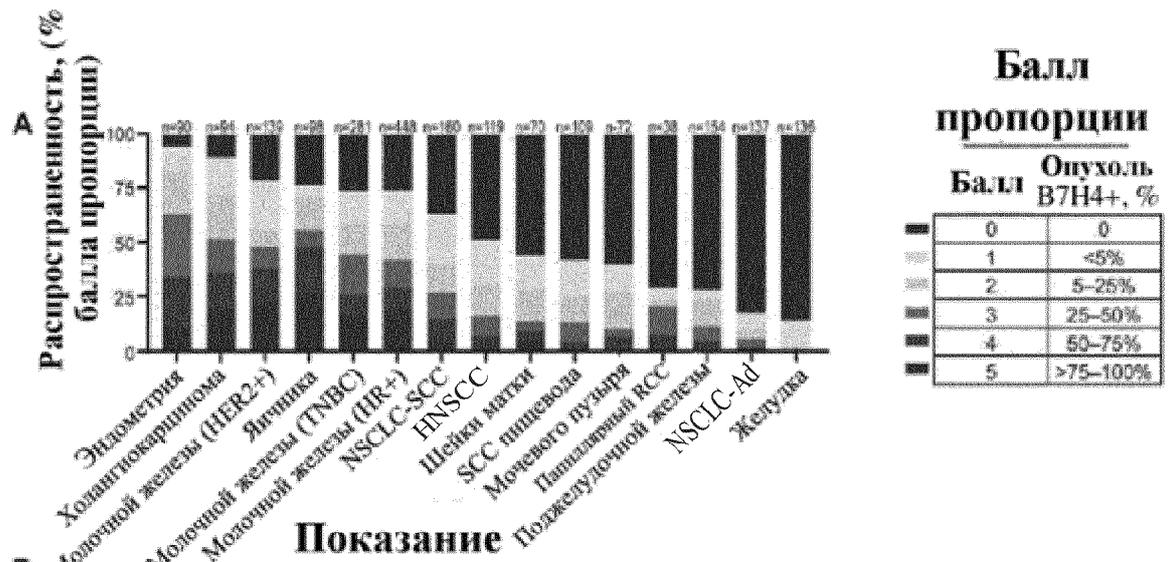
Однократная
доза ADC, I.V.

Фигура 9

**Комбинация ADC к V7H4 + ATRi
с E02-GL-SG3932,
ксенотрансплантат TNBC из
клеток MDA-MB-468**

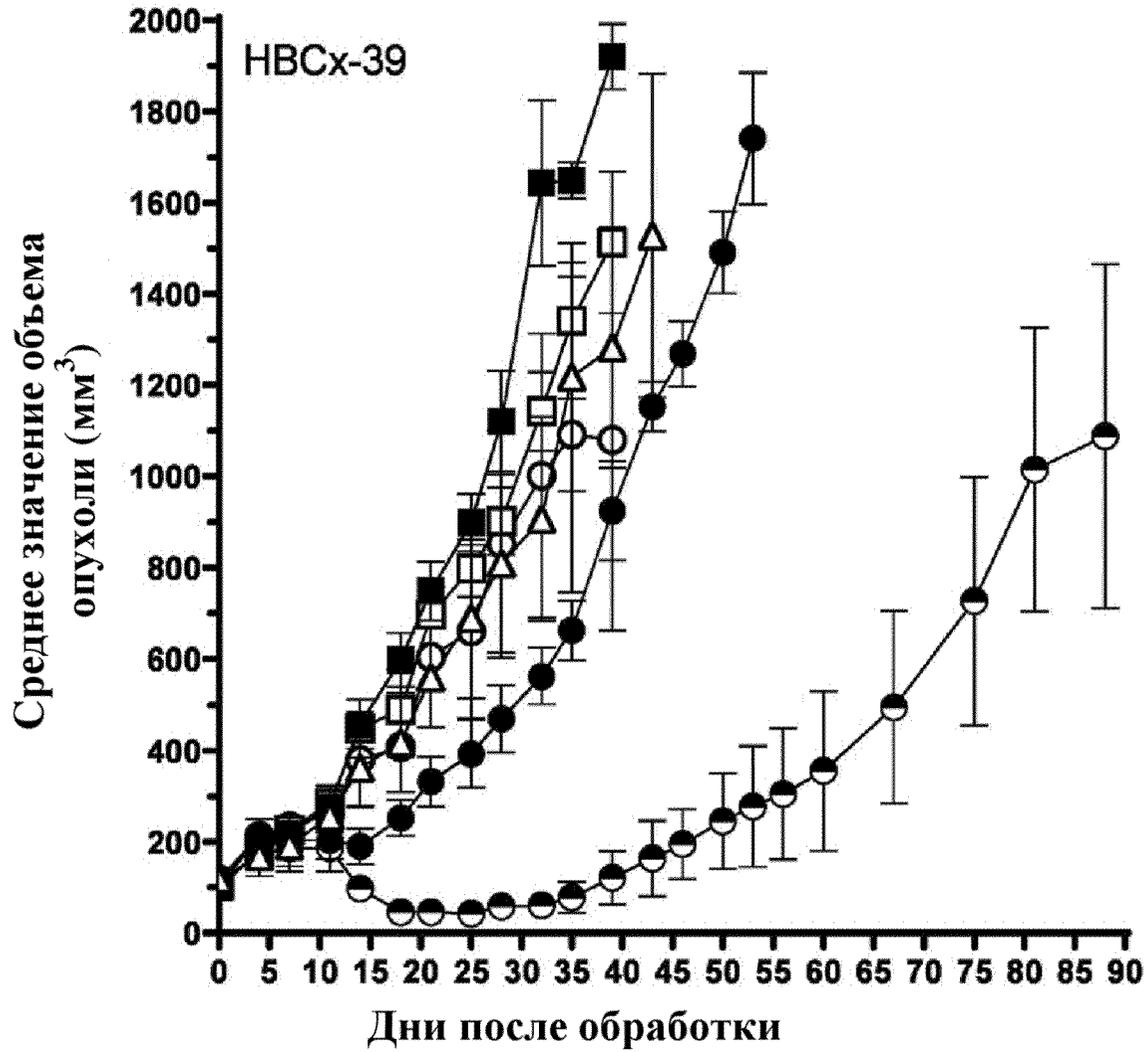


Фигура 10

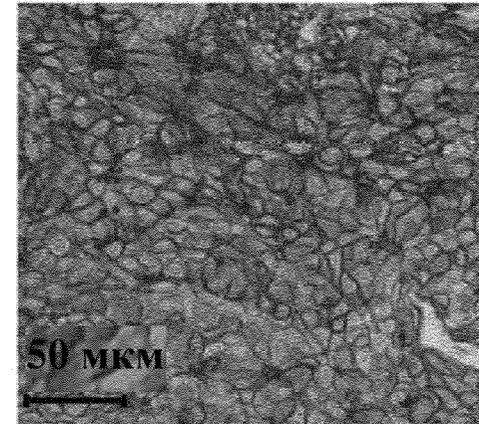


Фигура 11

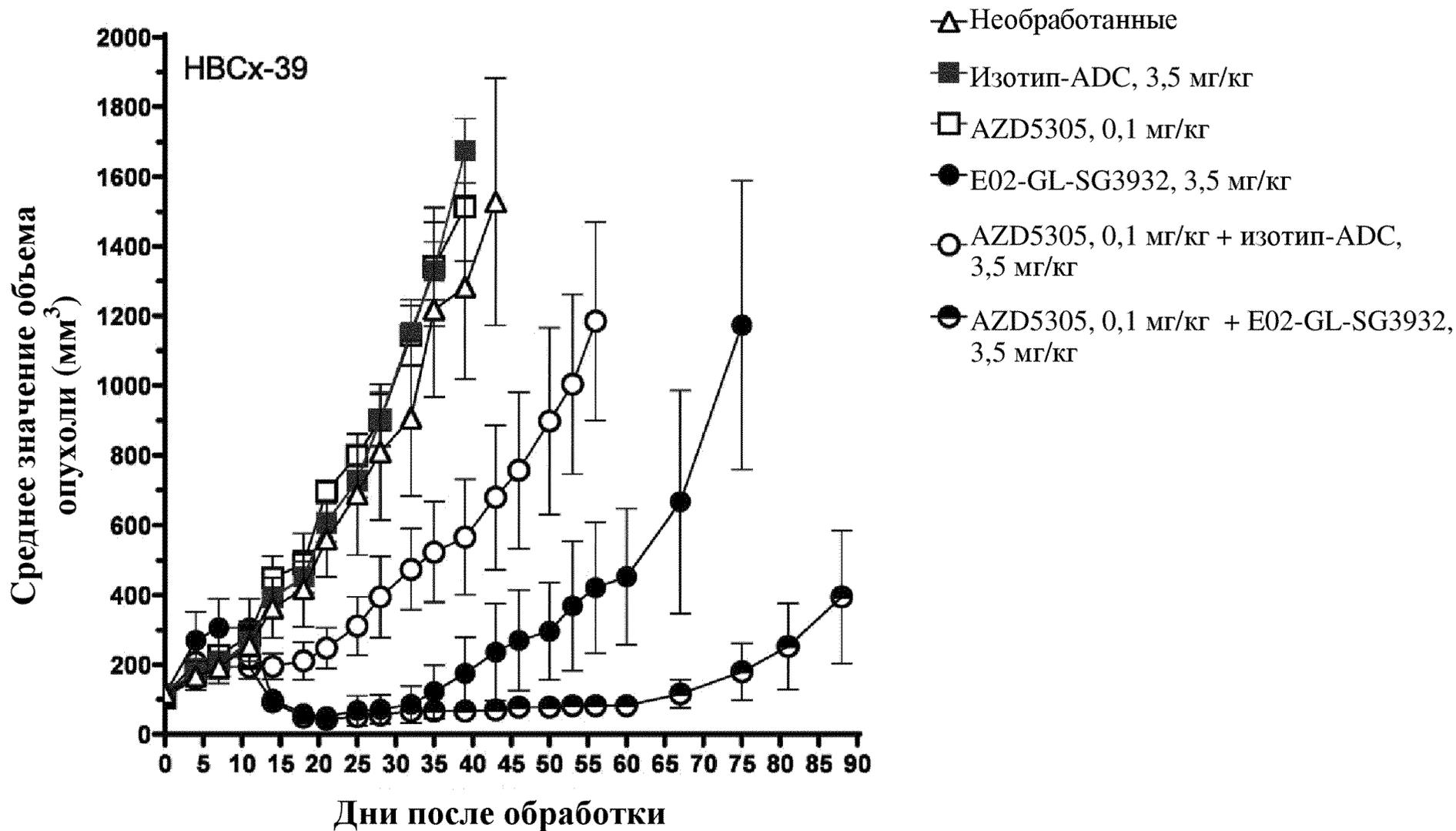
Фигура 12А



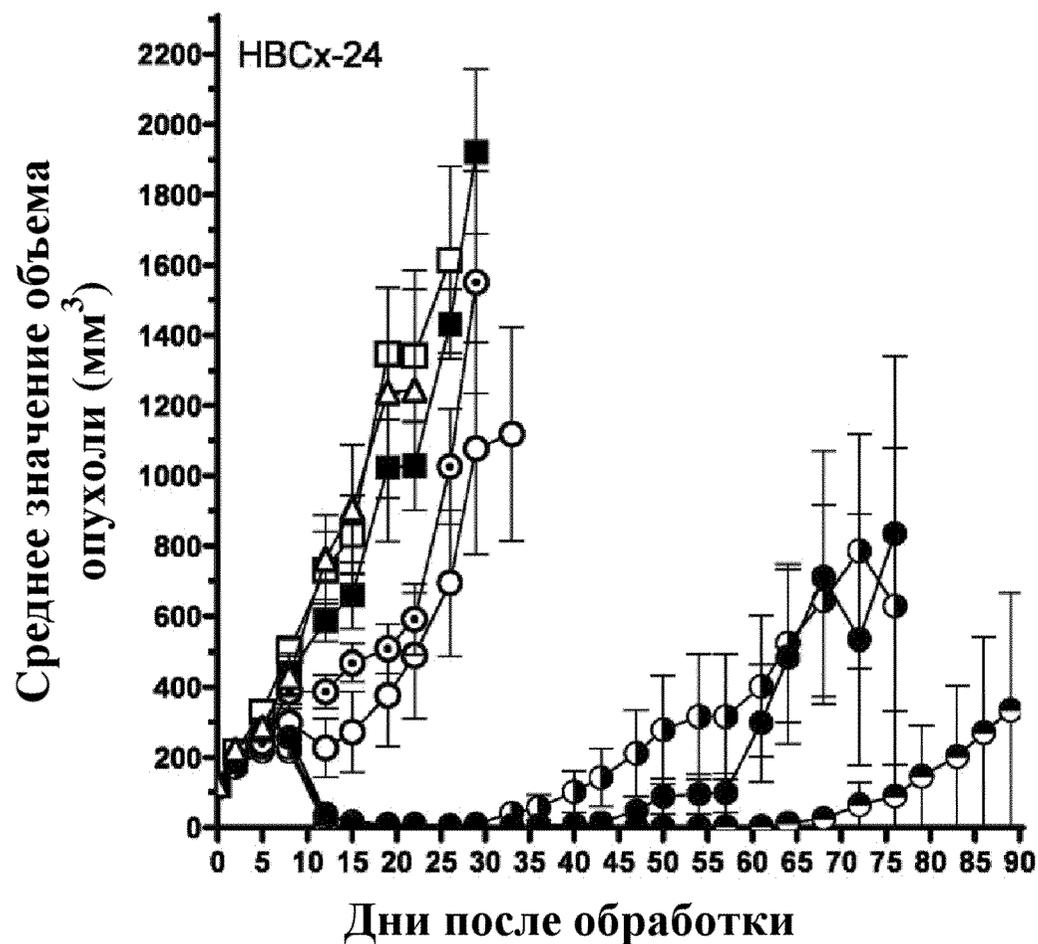
- △ Необработанные
- Изотип-ADC, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг
- E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + изотип-ADC, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг



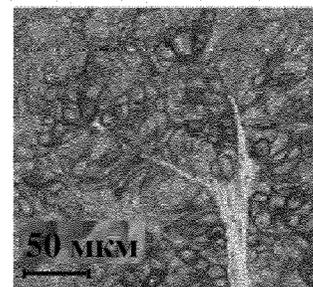
Фигура 12В



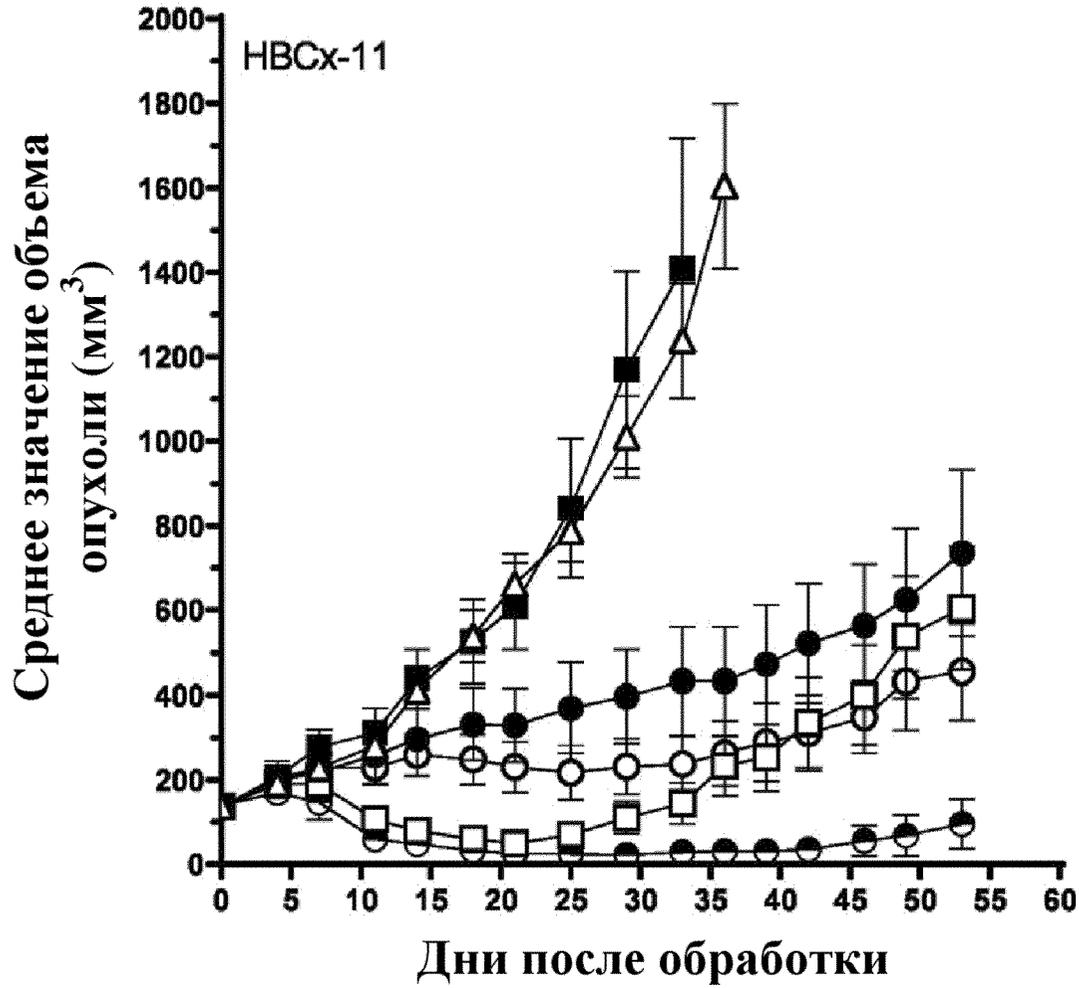
Фигура 12С



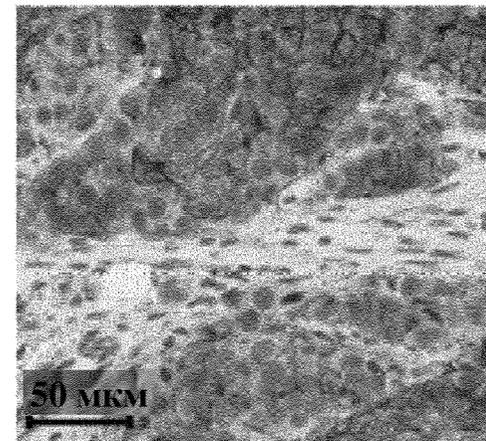
- △ Необработанные
- Изотип-ADC, 3,5 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг
- E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг
- E02-GL-SG3932, 3,5 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + изотип-ADC, 3,5 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + E02-GL-SG3932, 3,5 мг/кг



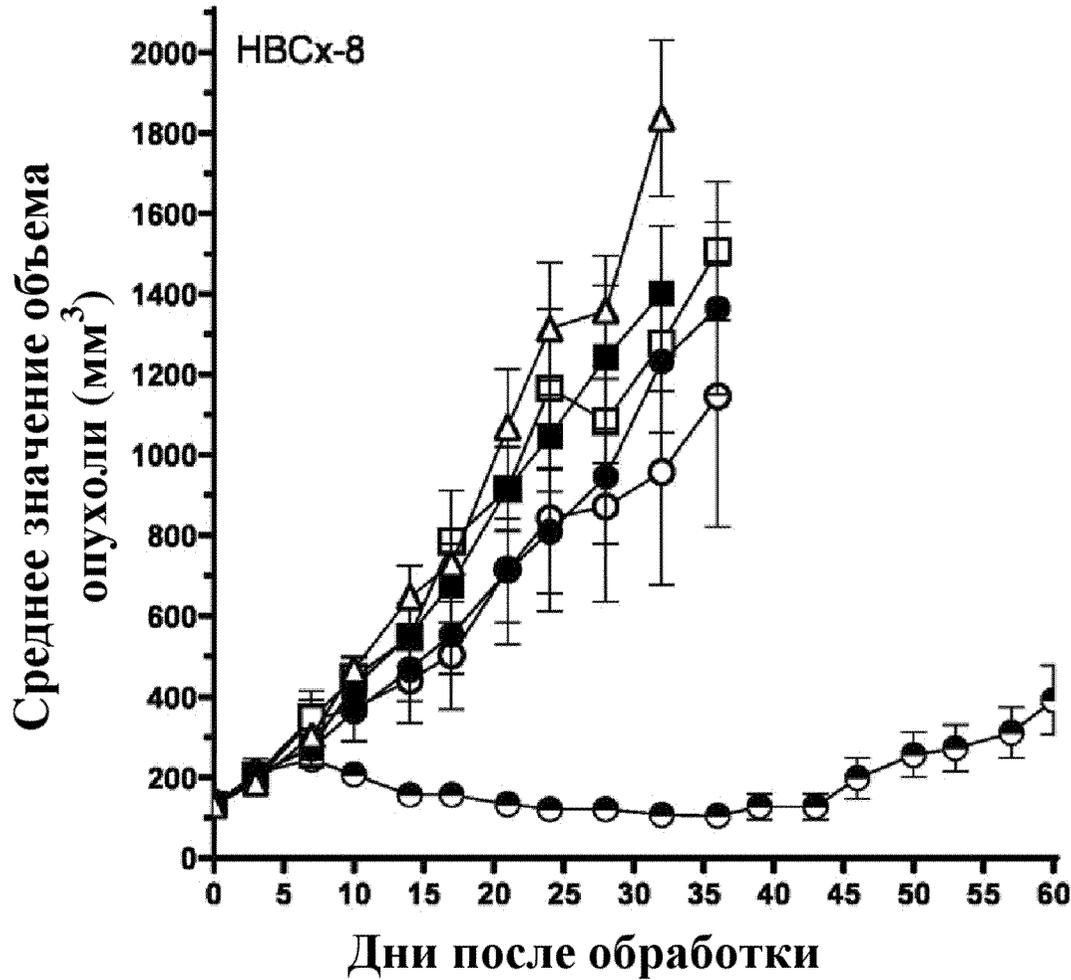
Фигура 12D



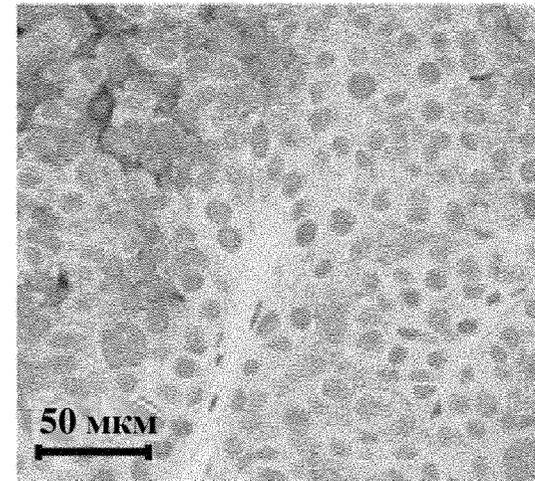
- △ Необработанные
- Изотип-ADC, 0,5 мг/кг
- E02-GL-SG3932, 0,5 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + изотип-ADC, 0,5 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + E02-GL-SG3932, 0,5 мг/кг



Фигура 12Е



- △ Необработанные
- Изотип-ADC, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг
- E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + изотип-ADC, 1,25 мг/кг
- AZD5305, 0,1 мг/кг + E02-GL-SG3932, 1,25 мг/кг



Фигура 12F

