

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042568**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.27

(21) Номер заявки
201892343

(22) Дата подачи заявки
2017.04.13

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ В7-Н3 СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОНЬЮГАТЫ
АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/323,228; 62/323,249; 62/432,314**

(32) **2016.04.15; 2016.04.15; 2016.12.09**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/027317**

(87) **WO 2017/180813 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЭКРОУДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Лу Дерик Т., Хуан Лин, Джонсон
Лесли С., Сон Томас, Скрибнер
Джунипер, Бонвини Эзио (US)**

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **US-A1-20150274838
WO-A1-2015184203
US-A1-20140322129
US-A1-20140328750**

(57) Изобретение направлено на новые В7-Н3-связывающие молекулы, такие как антитела, диатела или их эпитопсвязывающие фрагменты, способные связываться с В7-Н3 человеческой и нечеловеческой природы, и, в частности, на такие молекулы, которые являются перекрестно-реактивными с В7-Н3 приматов, отличных от человека (например, яванского макака). Предложенные В7-Н3-связывающие молекулы включают переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:20 и переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:21, которые были гуманизированы для того, чтобы проявлять сниженную иммуногенность при введении объектам-реципиентам. Также предлагаются конъюгаты В7-Н3-связывающей молекулы изобретения и лекарственного средства. В7-Н3-Связывающие молекулы или их конъюгаты по изобретению могут быть включены в состав фармацевтических композиций. Молекулы по изобретению и содержащие их композиции могут найти применение в лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией В7-Н3 или характеризующегося экспрессией В7-Н3, такого как рак.

B1**042568****042568****B1**

Перекрестная ссылка на связанные заявки

Эта заявка испрашивает приоритет по патентным заявкам США № 62/432314 (подана 9 декабря 2016 г.; рассматривается), 62/323249 (подана 15 апреля 2016 г.; рассматривается), 62/323228 (подана 15 апреля 2016 г.; рассматривается), каждая из которых включена в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

Ссылка на перечень последовательностей

Это заявка включает один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 CFR 1.821 и далее, которые раскрываются на машиночитаемых носителях (название файла: 1301_0143-0144PCT_ST25.txt, создан 28 марта 2017 г. и имеет размер 104 762 байта), который включен в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение направлено на новые В7-Н3-связывающие молекулы, способные связывать В7-Н3 человеческой природы и нечеловеческой природы, и, в частности, на такие молекулы, которые являются перекрестно-реактивными с В7-Н3 приматов, отличных от человека (например, яванского макака). Изобретение дополнительно относится к В7-Н3-связывающим молекулам, которые включают переменные домены легкой цепи и/или переменные домены тяжелой цепи (VH), которые были гуманизированы и/или деиммунизированы для того, чтобы проявлять сниженную иммуногенность при введении объектам-реципиентам. Изобретение, в частности, относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим В7-Н3-связывающим молекулам, включая биспецифические диатела, BiTE, биспецифические антитела, трехвалентные связывающие молекулы и т.д., которые включают: (i) такие В7-Н3-связывающие переменные домены и (ii) домен, способный связываться с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают любую из таких В7-Н3-связывающих молекул, и к способам, связанным с применением любой из таких В7-Н3-связывающих молекул при лечении рака и других заболеваний и состояний. Изобретение также, в частности, относится к молекуле, которая включает домен, связывающий В7-Н3 человека, гуманизированного антитела против В7-Н3 человека, конъюгированного по меньшей мере с одним лекарственным компонентом ("В7-Н3-ADC"). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают такие В7-Н3-ADC, и к способам, связанным с применением любого из таких В7-Н3-ADC при лечении рака и других заболеваний и состояний.

Предшествующий уровень техники

Рост и метастазирование опухолей во многом зависят от их способности уклоняться от иммунного надзора хозяина и преодолевать защиту хозяина. Большинство опухолей экспрессируют антигены, которые могут быть распознаны в значительной степени иммунной системой хозяина, но во многих случаях неадекватный иммунный ответ возникает из-за неэффективной активации эффекторных Т-клеток (Khawli, L.A. et al. (2008) "Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors" *Exper. Pharmacol.* 181:291-328).

I. Суперсемейство В7 и В7-Н3

В7-Н3 является представителем суперсемейства В7-CD28 и экспрессируется на антигенпредставляющих клетках. Он связывается с Т-клетками, однако контр-рецептор В7-Н3 на поверхности таких Т-клеток еще не полностью охарактеризован.

В7-Н3 уникален тем, что основная человеческая форма содержит два внеклеточных домена с tandemами IgV-IgC (т.е. IgV-IgC-IgV-IgC) (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands" *Genome Biol.* 6:223.1-223.7). Хотя первоначально предполагалось, что он содержит только 2 домена Ig (IgV-IgC), был идентифицирован вариант с четырьмя внеклеточными иммуноглобулиновыми доменами ("4Ig-B7-Н3") и он был признан более распространенной формой белка в человеке (Sharpe, A.H. et al., (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Однако естественная форма у мышей (2Ig) и форма 4Ig у человека демонстрируют сходную функцию (Hofmeyer K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-Н3", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30): 10277-10278). Молекула 4Ig-B7-Н3 ингибирует опосредованный NK-клетками лизис раковых клеток (Castriconi, R. et al. "Identification Of 4Ig-B7-Н3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34): 12640-12645). Сообщается, что В7-Н3 человека (форма 2Ig) способствует активации Т-клеток и продуцированию IFN- γ путем связывания с предполагаемым рецептором на активированных Т-клетках (Chapoval, A. et al. (2001) "B7-Н3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production", *Nature Immunol.* 2:269-274), однако более поздние исследования указывают на ингибирующую роль В7-Н3 мыши и В7-Н3 человека (Prasad, D.V., et al. (2004) "Murine B7-Н3 Is A Negative Regulator Of T Cells", *J Immunol.* 173:2500-2506; Leitner, J., et al. (2009) "B7-Н3 Is A Potent Inhibitor Of Human T-Cell Activation: No Evidence For B7-Н3 And TREML2 Interaction", *Eur. J. Immunol.* 39:1754-1764; Veenstra, R.G., et al. (2015) "B7-Н3 expression in Dnor T Cells and Host Cells Negatively Regulates Acute Graft-Versus-Host Disease Lethality", *Blood* 125:3335-3346). Экспрессия мРНК В7-Н3 была обнаружена в клетках сердца, почки, яичка, легкого, печени, поджелудочной железы, предстательной железы, толстой кишки и в остеобластах (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", *Genome*

Biol. 6:223.1-223.7). На уровне белка B7-H3 обнаруживается в печени, легких, мочевом пузыре, яичке, предстательной железе, молочной железе, плаценте и лимфоидных органах человека (Hofmeyer K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278).

Хотя B7-H3 не экспрессируется в покоящихся В- или Т-клетках, моноцитах или дендритных клетках, он индуцируется на дендритных клетках с помощью IFN- γ и на моноцитах с помощью GM-CSF (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Механизм действия B7-H3 является сложным, и сообщается, что белок опосредует как костимуляцию, так и коингибирование Т-клеток (Hofmeyer K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298; Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition", J. Mol. Med. 83:193-202). B7-H3 связывается с еще неидентифицированным рецептором(ами), опосредуя коингибирование Т-клеток. Кроме того, B7-H3 через взаимодействия с неизвестным рецептором(ами) является ингибитором NK-клеток и остеобластов (Hofmeyer K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278). Ингибирование может действовать посредством взаимодействий с представителями основных сигнальных путей, через которые рецептор Т-клеток (TCR) регулирует транскрипцию генов (например, факторы NFTA, NF- κ B или AP-1). Считается, что B7-H3 ингибирует Th1, Th2 или Th17 *in vivo* (Prasad, DV et al. (2004) "Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells", J. Immunol. 173:2500-2506; Fukushima, A. et al. (2007) "B7-H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice" Immunol. Lett. 113:52-57; Yi, K.H. et al. (2009) "Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4", Immunol. Rev. 229:145-151).

II. B7-H3-экспрессирующие опухоли.

Известно также, что B7-H3 экспрессируется в различных раковых клетках (например, нейробластомы, рака желудка, яичника, немелкоклеточного рака легкого и т.д., см., например, Modak, S., et al. (2001) "Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors" Cancer Res 61:4048-54) и культивируемых раковых клетках. Несколько независимых исследований показали, что раковые клетки человека проявляют заметное увеличение экспрессии белка B7-H3 и что эта повышенная экспрессия связана с повышенной тяжестью заболевания (Zang, X. et al. (2007) "The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition" Clin. Cancer Res. 13:5271-5279; Sun, Y., et al. (2006) "B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer" Lung Cancer 53:143-51; Tekle, C, et al. (2012) "B7-H3 Contributes To The Metastatic Capacity Of Melanoma Cells By Modulation Of Known Metastasis-Associated Genes", Int. J. Cancer 130:2282-90; Wang, L., et al. (2013) "B7-H3 Mediated Tumor Immunology: Friend Or Foe?", Int. J. Cancer 134(12):2764-2771), что подтверждает, что B7-H3 используется опухолями в качестве пути ухода из под иммунологического надзора (Hofmeyer, K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278).

Экспрессия белка B7-H3 также была иммуногистологически обнаружена в линиях опухолевых клеток (Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production" Nature Immunol. 2:269-274; Saatian, B. et al. (2004) "Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation", Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287:L217-L225; Mather, J. et al, WO 2004/001381; Castriconi et al. (2004) "Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34): 12640-12645; Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes", J. Immunol. 168:6294-6297).

Роль B7-H3 в ингибировании иммунной системы и увеличение экспрессии B7-H3 на опухолях человека предполагает, что эта молекула может служить терапевтической мишенью для лечения рака. Таким образом, было предложено применение анти-B7-H3 антител и других молекул, которые модулируют экспрессию B7-H3, для лечения опухолей и/или положительной модуляции иммунного ответа (см. Loo, D. et al. (2012) "Development of an Fc-Enhanced Anti-B7-H3 Monoclonal Antibody with Potent Antitumor Activity" Clin Cancer Res; 18: 3834-3845; Ahmed, M. et al. (2015) "Humanized Affinity-Matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Anti-Tumor Activity and Binds to FG Loop of B7-H3", J. Biol. Chem. 290: 30018-30029; Nagase-Zembutsu, A. et al. (2016) "Development of DS-5573a: A novel afucosylated monoclonal antibody directed at B7-H3 with potent antitumor activity" Cancer Sci. 2016, doi: 10.1111/cas.12915; Modak, S. et al. (March 1999) "Disialoganglioside GD2 And Antigen 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small Round Cell Tumor (DSRCT) And Rhabdomyosarcoma (RMS)" Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting, Vol. 40:474 (9th Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research, Philadelphia, Pennsylvania, US; April 10-14, 1999; Modak, S. et al. (March 2000) "Radioimmunotargeting To Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9" Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 41:724; Modak, S. et al. (2001) "Monoclonal Antibody 8H9 Targets A Novel Cell Surface Antigen Expressed By A Wide Spectrum Of Human Solid Tumors", Cancer Res. 61(10):4048-4054; Steinberger, P. et al. (2004) "Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains", J. Immunol. 172(4):2352-2359; Xu, H. et al. (2009) "MicroRNA miR-29 Modulates

Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors", Cancer Res. 69(15):5275-6281; см. также пат. США №№ 7279567, 7358354, 7368554, 7527969, 7718774, 8216570, 8779098, 8802091, 9150656, публ. пат. США №№ 2002/0168762; 2005/0202536, 2008/0081346, 2008/0116219, 2009/0018315, 2009/0022747, 2009/0087416, 2013/0078234, 2015/0274838, публ. РСТ № WO 2008/066691; WO 2006/016276; WO 2008/116219; WO 04/001381, WO 2001/094413, WO 2002/10187, WO 2002/32375, WO 2004/093894, WO 2006/016276, WO 2008/116219/WO 2011/109400 и EP 1292619B.

Несмотря на все такие предварительные успехи, существует потребность в дополнительных терапевтических агентах, которые нацеливаются и убивают опухолевые клетки, экспрессирующие B7-H3. Настоящее изобретение призвано решить эту и другие задачи.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на новые B7-H3-связывающие молекулы, способные связываться с B7-H3 человеческой и нечеловеческой природы, и в частности с такими молекулами, которые являются перекрестно-реактивными с B7-H3 приматов, отличных от человека (например, яванского макака). Изобретение дополнительно относится к молекулам связывания B7-H3, которые включают переменные домены легкой цепи и/или переменные домены тяжелой цепи (VH), которые были гуманизированы и/или деиммунизированы для того, чтобы они проявляли сниженную иммуногенность при введении объектам-реципиентам. Изобретение, в частности, относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим B7-H3-связывающим молекулам, включая биспецифические диатела, BiTE, биспецифические антитела, трехвалентные связывающие молекулы и т.д. которые включают: (i) такие B7-H3-связывающие переменные домены и (ii) домен, способный связываться с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают любую из таких B7-H3-связывающих молекул, и к способам, связанным с применением любой из таких B7-H3-связывающих молекул при лечении рака и других заболеваний и состояний. Изобретение также, в частности, относится к молекуле, которая включает домен, связывающий B7-H3 человека из гуманизованного антитела против B7-H3 человека, конъюгированного по меньшей мере с одним лекарственным компонентом ("B7-H3-ADC"). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают такие B7-H3-ADC, и к способам, связанным с применением любого из таких B7-H3-ADC при лечении рака и других заболеваний и состояний.

В частности, один из аспектов настоящего изобретения обеспечивает молекулу, связывающую B7-H3, которая включает переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH), в котором упомянутый домен переменной цепи содержит домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}, а указанный переменный домен легкой цепи содержит домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3}, в котором по меньшей мере три из указанных доменов, по меньшей мере четыре из указанных доменов, по меньшей мере пять из указанных доменов или все указанные домены выбраны из группы, состоящей из:

- (1) домен CDR_{H1}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (2) домен CDR_{H2}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;
- (3) домен CDR_{H3}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29;
- (4) Домен CDR_{L1}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23;
- (5) домен CDR_{L2}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и
- (6) домен CDR_{L3}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

Изобретение дополнительно относится к воплощению такой B7-H3-связывающей молекулы, которая включает указанный переменный домен легкой цепи (VL), который включает домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH), который включает домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}, где:

- (1) указанный домен CDR_{H1} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (2) указанный домен CDR_{H2} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;
- (3) указанный домен CDR_{H3} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

Изобретение дополнительно относится к воплощению такой B7-H3-связывающей молекулы, которая включает указанный переменный домен легкой цепи (VL), который включает домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH), который включает домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}, где:

- (1) указанный домен CDR_{L1} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23;
- (2) указанный домен CDR_{L2} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; и
- (3) указанный домен CDR_{L3} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

Изобретение дополнительно относится к воплощению таких B7-H3-связывающих молекул, где указанный переменный домен тяжелой цепи (VH) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:31.

Изобретение дополнительно относится к воплощению таких B7-H3-связывающих молекул, где указанный переменный домен легкой цепи (VL) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:30.

Изобретение дополнительно относится к В7-Н3-связывающим молекулам, которые включают домен VL и домен VH, где указанный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

Изобретение дополнительно относится к В7-Н3-связывающим молекулам, которые включают домен VL и домен VH, где указанный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

Изобретение дополнительно относится к В7-Н3-связывающим молекулам, которые включают домен VL и домен VH, где указанный домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, а указанный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

Изобретение также относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где молекула представляет собой антитело или его эпитопсвязывающий фрагмент. Изобретение также относится к воплощениям такой В7-Н3-связывающей молекулы, где молекула представляет собой биспецифическое антитело или диатело, особенно диатело или комплекс диатела, которые содержат две, три, четыре или пять полипептидных цепей, каждая из которых имеет N-конец и С-конец, где такие полипептидные цепи связаны друг с другом через одну или несколько ковалентных связей, и особенно одну или несколько ковалентных дисульфидных связей. Изобретение дополнительно относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где молекула представляет собой трехвалентную связывающую молекулу, и особенно в которой трехвалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре, пять или более полипептидных цепей. Изобретение также относится к воплощению такой В7-Н3-связывающей молекулы, где молекула включает домен Fc. Изобретение дополнительно относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где молекула представляет собой диатело и включает домен, связывающий альбумин, и, в частности, деиммунизированный домен, связывающий альбумин.

Изобретение также относится к воплощениям всех таких В7-Н3-связывающих молекул, которые дополнительно содержат домен Fc, и особенно где домен Fc является вариантным доменом Fc, который содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, уменьшающих аффинность вариантного домена Fc для Fc γ R и/или увеличивающих период полувыведения в сыворотке В7-Н3-связывающей молекулы, а более конкретно, где модификации включают по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) L234A;
- (b) L235A;
- (c) L234A и L235A;
- (d) M252Y; M252Y и S254T;
- (e) M252Y и T256E;
- (f) M252Y, S254T и T256E;
- (g) K288D и H435K;

где нумерация - это индекс EU, как у Kabat.

Изобретение также относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где молекула является биспецифичной, и особенно относится к воплощению, в котором молекула содержит два эпитопсвязывающих сайта, способных к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом В7-Н3 и два эпитопсвязывающих сайта, способных к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки, или к воплощению, в котором молекула содержит один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом В7-Н3 и один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки.

Изобретение дополнительно относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где молекула представляет собой трехвалентную связывающую молекулу и, в частности, относится к воплощениям, в которых молекула содержит один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом В7-Н3, один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом первой молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки; и один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом второй молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки, причем такие первая и вторая молекулы не являются В7-Н3.

Изобретение далее относится к воплощению такой В7-Н3-связывающей молекулы, где молекула способна одновременно связываться с В7-Н3 и со вторым эпитопом и, в частности, относится к воплощению, в котором второй эпитоп является эпитопом второй молекулы присутствующей на поверхности эффекторной клетки (особенно в которой второй эпитоп представляет собой эпитоп CD2, CD3, CD8, CD16, TCR или NKG2D и наиболее конкретно, где второй эпитоп является эпитопом CD3). Изобретение дополнительно относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где эффекторные клетки представляют собой цитотоксическую Т-клетку или клетку-естественный киллер (NK). Изобретение дополнительно относится к воплощению таких В7-Н3-связывающих молекул, где молекула также способна связывать третий эпитоп и, в частности, относится к воплощению, в котором третий эпитоп является

эпитопом CD8. Изобретение также относится к воплощениям таких молекул, где молекула опосредует координированное связывание клетки, экспрессирующей В7-Н3, и цитотоксической Т-клетки.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим эффективное количество любой из вышеописанных В7-Н3-связывающих молекул, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Изобретение дополнительно направлено на применение любой из вышеописанных В7-Н3-связывающих молекул, при лечении заболевания или состояния, связанного с В7-Н3 или характеризуемого экспрессией В7-Н3, или способ лечения заболевания или состояния, которое характеризуется экспрессией В7-Н3, в частности, где заболевание или состояние, связанное с экспрессией В7-Н3 или характеризующее экспрессией В7-Н3, является раком, а более конкретно, где рак выбран из группы, состоящей из опухоли надпочечников, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, В-клеточной неоплазии, рака молочной железы, опухоли сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, язвенной карциномы клетки, рака ободочной кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, опухоли зародышевых клеток, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли парашитовидной железы, детского онкологического заболевания, опухоли периферических нервных оболочек, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, увеальной меланомы заднего полюса, почечного метастатического рака, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

Второй аспект настоящего изобретения относится к молекуле, которая включает домен, связывающий В7-Н3 человека, из гуманизированного антитела против В7-Н3 человека, конъюгированного по меньшей мере с одним лекарственным компонентом ("В7-Н3-ADC"). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают такие В7-Н3-ADC, и к способам, связанным с применением любого из таких В7-Н3-ADC при лечении рака и других заболеваний и состояний.

В частности, изобретение относится к конъюгату лекарственного средства и анти-В7-Н3 антитела (В7-Н3-ADC), имеющему формулу



где Ab представляет собой антитело, которое связывается с В7-Н3, включающее гуманизированный переменный домен тяжелой цепи (VH) и гуманизированный переменный домен легкой цепи (VL), или его В7-Н3-связывающий фрагмент;

D представляет собой цитотоксический лекарственный компонент;

LM является линкерной молекулой, которая ковалентно связывается с Ab и D;

m представляет собой целое число от 0 до n и обозначает количество линкерных молекул в В7-Н3-ADC;

n представляет собой целое число от 1 до 10 и обозначает количество цитотоксических лекарственных форм, ковалентно связанных с ADC.

Кроме того, изобретение относится к такому В7-Н3-ADC, в котором линкерная молекула LM отсутствует (т.е. m = 0), и В7-Н3-ADC, которые обладают более чем одной линкерной молекулой LM (т.е. m представляет собой целое число от 2 до n), где каждая из линкерных молекул LM ковалентно связывает цитотоксический лекарственный компонент D с Ab такого В7-Н3-ADC. Кроме того, настоящее изобретение относится к таким В7-Н3-ADC, Ab которых ковалентно связаны с более чем одной линкерной молекулой LM, где все такие линкерные молекулы идентичны. Цитотоксические лекарственные компоненты D, которые ковалентно связаны с Ab таких В7-Н3-ADC, могут быть все одинаковыми или могут включать 2, 3, 4, или более неидентичных цитотоксических лекарственных фрагментов D. Кроме того, настоящее изобретение относится к таким В7-Н3-ADC, в которых Ab ковалентно связано с более чем одной линкерной молекулой LM, где все такие линкерные молекулы не идентичны. Цитотоксические лекарственные компоненты D, которые ковалентно связаны с Ab таких В7-Н3-ADC, могут быть все одинаковыми или могут включать 2, 3, 4 или более неидентичных цитотоксических лекарственных фрагментов D.

Изобретение далее обеспечивает такие В7-Н3-ADC, в которых:

(A) (i) гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99

и

(ii) гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104;

или

(B) (i) гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20

и

(ii) гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21;

или

(C) (i) гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30

и

(ii) гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, в которых гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, а гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, в которых гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, а гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

Кроме того, изобретение обеспечивает такие B7-H3-ADC, в которых гуманизированный гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, а гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, в которых Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела.

Изобретение далее обеспечивает такие B7-H3-ADC, где B7-H3-ADC включает домен Fc из IgG человека (особенно IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека).

Изобретение далее обеспечивает такие B7-H3-ADC, где B7-H3-ADC содержит вариантный домен Fc, который включает:

(a) одну или несколько аминокислотных модификаций, которые уменьшают аффинность вариант-ного домена Fc по отношению к FcγR; и/или

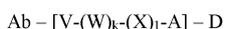
(b) одна или несколько аминокислотных модификаций, которые увеличивают период полувыведе-ния в сыворотке вариантного домена Fc.

Изобретение далее обеспечивает такие B7-H3-ADC, которые включают вариантный домен Fc, при-чем модификации, которые уменьшают аффинность вариантного домена Fc по отношению к FcγR, вклю-чают замену L234A; L235A; или L234A и L235A, где нумерация соответствует нумерации индекса EU, как у Kabat.

Изобретение далее обеспечивает такие B7-H3-ADC, которые включают вариантный домен Fc, при-чем модификации, которые улучшают период полувыведения в сыворотке вариантного домена Fc, вклю-чают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, где нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, в которых по меньшей мере один из LM является линкерной молекулой, и в частности, где линкерная молекула является пептидным линкером и/или расщепляемым линкером.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, в которых молекула имеет формулу



где V - расщепляемая линкерная молекула LM;

(W)_k-(X)_l-A - удлиненная самоэлиминируемая спейсерная система, которая самоэлиминируется по-средством 1_k(4+2n)-элиминации;

W и X каждый представляют собой спейсер каскада электронов а 1_k(4+2n), которые являются оди-наковыми или различными;

A представляет собой либо спейсерную группу формулы (Y)_m, где Y представляет собой а 1_k(4+2n) спейсер каскада электронов, или группу формулы U, являющуюся спейсером для исключения циклиза-ции;

k, l и m независимо представляют собой целое число от 0 (включительно) до 5 (включительно),

n представляет собой целое число от 0 (включительно) до 10 (включительно),

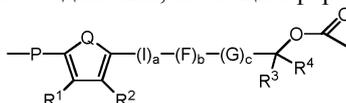
при условии, что:

когда A представляет собой (Y)_m: тогда k + l + m ≥ 1, и

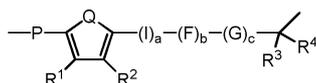
если k + l + m = 1, то n > 1;

когда A равно U: тогда k + l ≥ 1;

W, X и Y независимо выбраны из соединений, имеющих формулу



или формулу

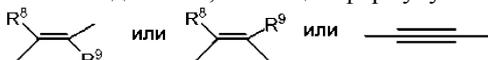


где Q представляет собой $-R^5C=CR^6-$, S, O, NR^5 , $-R^5C=N-$ или $-N=CR^5-$;

P представляет собой NR^7 , O или S;

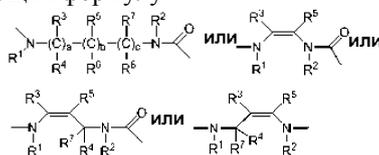
a, b и c независимо представляют собой целое число от 0 (включительно) до 5 (включительно);

I, F и G независимо выбраны из соединений, имеющих формулу



где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 независимо представляют собой H, C_{1-6} алкил, C_{3-20} гетероциклил, C_{5-20} арил, C_{1-6} алкокси, гидроксильные (OH), амино (NH_2), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино ($NR_x^1R_x^2$), нитро (NO_2), галоген, CF_3 , CN, $CONH_2$, SO_2Me , $CONHMe$, циклический C_{1-5} алкиламино, имидазол, C_{1-6} алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси ($COOH$), карбоксилат ($COOR_x$), сульфоксиды ($S(=O)_2OH$), сульфонаты ($S(=O)_2OR_x$), сульфонила ($S(=O)_2R_x$), сульфиды ($S(=O)OH$), сульфиды ($S(=O)OR_x$), сульфиды ($S(=O)R_x$), фосфоноксиды ($OP(=O)(OH)_2$) и фосфаты ($OP(=O)(OR_x)_2$), где R_x , R_x^1 и R_x^2 независимо выбраны из C_{1-6} алкильной группы, C_{3-20} гетероциклической группы или C_{5-20} арильной группы, два или более заместителей R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 или R^9 необязательно соединены друг с другом с образованием одной или нескольких алифатических или ароматических циклических структур;

U выбран из соединений, имеющих формулу



где a, b и c независимо выбраны как целое число 0 или 1; при условии, что $a + b + c = 2$ или 3;

R^1 и/или R^2 независимо представляют собой H, C_{1-6} алкил, причем алкил необязательно замещен одной или несколькими из следующих групп: гидроксильные (OH), простой эфир (OR_x), амино (NH_2), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино ($NR_x^1R_x^2$), нитро (NO_2), галоген, CF_3 , CN, $CONH_2$, SO_2Me , $CONHMe$, циклический C_{1-5} алкиламино, имидазол, C_{1-6} алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси ($COOH$), карбоксилат ($COOR_x$), сульфоксиды ($S(=O)_2OH$), сульфонаты ($S(=O)_2OR_x$), сульфонила ($S(=O)_2R_x$), сульфоксиды ($S(=O)OH$), сульфиды ($S(=O)OR_x$), сульфиды ($S(=O)R_x$), фосфоноксиды ($OP(=O)(OH)_2$) и фосфаты ($OP(=O)(OR_x)_2$), где R_x , R_x^1 и R_x^2 выбраны из C_{1-6} алкильной группы, C_{3-20} гетероциклической группы или C_{5-20} арильной группы; и

R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 и R^8 независимо представляют собой H, C_{1-6} алкил, C_{3-20} гетероциклил, C_{5-20} арил, C_{1-6} алкокси, гидроксильные (OH), амино (NH_2), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино ($NR_x^1R_x^2$), нитро (NO_2), галоген, CF_3 , CN, $CONH_2$, SO_2Me , $CONHMe$, циклический C_{1-5} алкиламино, имидазол, C_{1-6} алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси ($COOH$), карбоксилат ($COOR_x$), сульфоксиды ($S(=O)_2OH$), сульфонаты ($S(=O)_2OR_x$), сульфонила ($S(=O)_2R_x$), сульфоксиды ($S(=O)OH$), сульфиды ($S(=O)OR_x$), сульфиды ($S(=O)R_x$), фосфоноксиды ($OP(=O)(OH)_2$) и фосфаты ($OP(=O)(OR_x)_2$), где R_x , R_x^1 и R_x^2 выбраны из C_{1-6} алкильной группы, C_{3-20} гетероциклической группы или C_{5-20} арильной группы и два или более заместителей R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 или R^8 необязательно связаны друг с другом с образованием одной или нескольких алифатических или ароматических циклических структур.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, в которых линкерная молекула LM включает:

- (1) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (2) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (3) п-аммоциннаилоксикарбонил;
- (4) п-аминоциннаилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (5) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминоциннаилоксикарбонил;
- (6) п-аминоциннаилоксикарбонил-п-аминоциннаилоксикарбонил;
- (7) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил;
- (8) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминоциннаилоксикарбонил;
- (9) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (10) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил;
- (11) п-аминобензилоксикарбонил(метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (12) п-аминоциннаилоксикарбонил(метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (13) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (14) п-аминоиндинамикоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил(метиламино)этил(метиламино)карбонил;

(15) п-аминобензилоксикарбонил-п-арниноциннамиллоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)-карбонил;

(16) п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил(метиламино)этил(метиламино)карбонил;

(17) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензил;

(18) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензил;

(19) п-аминоциннамил;

(20) п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминобензил;

(21) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминоциннамил;

(22) п-амино-циннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамил;

(23) п-аминофенилпентадиенил;

(24) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминоциннамил;

(25) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминобензил или

(26) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминофенилпентадиенил.

Кроме того, изобретение предлагает такие В7-Н3-ADC, в которых линкерная молекула LM конъюгирована с боковой цепью аминокислоты полипептидной цепи Ab и связывает Ab с молекулой цитотоксического лекарственного компонента D и, в частности, где цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин, радиоизотоп, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, мРНК, РНКи, микроРНК, фотоактивный терапевтический агент, антиангиогенный агент, проапоптотический агент, пептид, липид, углевод, хелатирующий агент или их комбинации.

Кроме того, изобретение предлагает такие В7-Н3-ADC, в которых линкерная молекула LM конъюгирована с боковой цепью аминокислоты полипептидной цепи Ab и связывает Ab с молекулой цитотоксического лекарственного компонента D и, в частности, где цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин, выбранный из группы, состоящая из тубулизина (особенно цитотоксина тубулизина, выбранного из группы, состоящей из тубулизина А, тубулизина В, тубулизина С и тубулизина D), ауристатина (особенно цитотоксина ауристатина, выбранного из группы, состоящей из ММАЕ (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-норэфедрин) и ММАF (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-фенилаланин), майтанзиноида (особенно цитотоксина майтанзиноида, выбранного из группы, состоящей из майтанзина, DM1 и DM4), калихеамицина (особенно цитотоксина калихеамицина, выбранного из группы, состоящей из калихеамицина γ 1, калихеамицина β 1Vr, калихеамицина γ 1Vr, калихеамицина α 2I, калихеамицина α 3I, калихеамицина β 1I, калихеамицина γ 1I и калихеамицина Δ 1I), пирролобензодиазепина (особенно цитотоксина пирролобензодиазепина, выбранного из группы, состоящей из вадастуксимабатаририна, SJG-136, SG2000, SG2285 и SG2274) и дуокармицина (особенно цитотоксина дуокармицина, выбранного из группы, состоящей из дуокармицина А, дуокармицина В1, дуокармицина В2, дуокармицина С1, дуокармицина С2, дуокармицина D, дуокармицина SA, CC-1065, адозелезина, биелизина, карцелезина (U-80244) и спиро-дуокармицина (DUBA)).

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим эффективное количество любого из вышеописанных В7-Н3-ADC и фармацевтически приемлемого носителя, эксципиента или разбавителя.

Изобретение дополнительно направлено на применение любого из вышеописанных В7-Н3-ADC при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией В7-Н3 или характеризующегося экспрессией В7-Н3, или в способе лечения заболевания или состояния, характеризующихся экспрессией В7-Н3, в частности, где заболевание или состояние, связанное с экспрессией В7-Н3 или характеризующееся экспрессией В7-Н3, представляет собой рак, и более конкретно, где рак выбран из группы, состоящей из острого миелолейкоза, опухоли надпочечников, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, В-клеточной неоплазии, рака молочной железы, опухоли сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, язвенной карциномы клетки, рака ободочной кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, опухоли зародышевых клеток, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли парашитовидной железы, детского онкологического заболевания, опухоли периферических нервных оболочек, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, увеальной меланомы заднего полюса, почечного

метастатического рака, рабдоидной опухоли, рабдомизаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схема типичного ковалентно связанного диатела, имеющего два эпитопсвязывающих сайта, состоящих из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет E-спираль или K-спираль, способствующие образованию гетеродимера (ниже приведены альтернативные домены, способствующие образованию гетеродимера). Остаток цистеина может присутствовать в линкере и/или в домене, способствующем образованию гетеродимера, как показано на фиг. 3B. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с применением единой схемы затенения или заливки.

На фиг. 2 представлена схема типичной ковалентно связанной молекулы диатела, имеющей два эпитопсвязывающих сайта, состоящих из двух полипептидных цепей, каждый из которых имеет домен CH2 и CH3, так что связанные цепи образуют весь или часть домена Fc. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с применением единой схемы затенения или заливки.

На фиг. 3A-3C представлены схемы, показывающие репрезентативные ковалентно связанные четырехвалентные диатела, имеющие четыре эпитопсвязывающих участка, состоящих из двух пар полипептидных цепей (т.е. всего из целых 4 полипептидных цепей). Один полипептид каждой пары имеет домен CH2 и CH3, так что связанные цепи образуют весь или часть домена Fc. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с применением единой схемы затенения или заливки. Две пары полипептидных цепей могут быть одинаковыми. В таких воплощениях, где две пары полипептидных цепей являются одинаковыми, а домены VL и VH распознают разные эпитопы (как показано на фиг. 3A, 3B), полученная молекула обладает четырьмя эпитопсвязывающими сайтами и является биспецифической и двухвалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. В таких воплощениях, где домены VL и VH распознают один и тот же эпитоп (например, одни и те же CDR домена VL и одни и те же CDR домена VH используются в обеих цепях), полученная молекула обладает четырьмя эпитопсвязывающими сайтами и является моноспецифичной и четырехвалентной по отношению к одному эпитопу. В ином случае, две пары полипептидов могут быть разными. В таких воплощениях, где две пары полипептидных цепей различны, а домены VL и VH каждой пары полипептидов распознают разные эпитопы (как показано различными затенениями и рисунками на фиг. 3C), полученная молекула обладает четырьмя эпитопсвязывающими сайтами и является тетраспецифической и моновалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. На фиг. 3A показано диатело, содержащее домен Fc, который включает пептид домена, способствующего гетеродимеризации, содержащий остаток цистеина. На фиг. 3B показано диатело, содержащее домен Fc, которое включает домены, способствующие гетеродимеризации с E-спиралью и K-спиралью, которые содержат остаток цистеина и линкер (с необязательным остатком цистеина). На фиг. 3C показано диатело, содержащее область Fc, которое включает домены CH1 и CL антителя.

На фиг. 4A и 4B представлены схемы типичной молекулы ковалентно связанного диатела, включающего два эпитопсвязывающих участка, состоящих из трех полипептидных цепей. Две полипептидные цепи обладают доменами CH2 и CH3, так что связанные цепи образуют весь или часть домена Fc. Полипептидные цепи, содержащие домены VL и VH, дополнительно включают домен, способствующий гетеродимеризации. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с применением единой схемы затенения или заливки.

На фиг. 5 представлена схема типичной молекулы ковалентно связанного диатела, включающего четыре эпитопсвязывающих участка, состоящих из пяти полипептидных цепей. Две полипептидные цепи обладают доменами CH2 и CH3, так что связанные цепи образуют домен Fc, который включает весь или часть домена Fc. Полипептидные цепи, включающие связанные домены VL и VH, дополнительно содержат домен, способствующий гетеродимеризации. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с применением единой схемы затенения или заливки.

На фиг. 6A-6F представлены схемы типичных Fc доменов-содержащих трехвалентных связывающих молекул, имеющих три эпитопсвязывающих сайта. На фиг. 6A и 6B, соответственно, схематично показаны домены трехвалентных связывающих молекул, содержащие два домена связывания двух антителей и связывающий домен типа Fab, имеющий различные доменные ориентации, в которых связывающие домены по типу диатела являются N-концевыми или C-концевыми по отношению к домену Fc. Молекулы на фиг. 6A и 6B содержат четыре цепи. На фиг. 6C и 6D, соответственно, схематично показаны домены трехвалентных связывающих молекул, включающих связывающие домены по типу диатела, являющихся N-концевыми по отношению к домену Fc, и связывающий домен типа Fab, в котором легкая цепь и тяжелая цепь связаны через полипептидный спейсер или связывающий домен по типу scFv. Трехвалентные связывающие молекулы на фиг. 6E и 6F, соответственно, схематично иллюстрируют домены трехвалентных связывающих молекул, включающих два связывающих домена по типу диатела, которые являются C-концевыми по отношению к домену Fc, и связывающий домен Fab-типа, в котором легкая цепь и тяжелая цепь связаны через полипептидный спейсер или связывающий домен scFv-типа. Трехвалентные связывающие молекулы на фиг. 6C-6F содержат три цепи. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с применением единой схемы затенения или заливки.

На фиг. 7 показаны результаты скрининга анти-В7-Н3 антител, способных интернализироваться в раковых клетках поджелудочной железы Hs700T.

На фиг. 8А-8J показаны результаты исследования способности В7-Н3-ADC по настоящему изобретению опосредовать цитотоксичность *in vitro* против В7-Н3-экспрессирующих клеток рака молочной железы JMT-1 (фиг. 8А), клеток рака молочной железы MDA-MB-468 (фиг. 8В), клеток меланомы А375.52 (фиг. 8С), клеток немелкоклеточного рака легкого Calu-6 (фиг. 8D), клеток немелкоклеточного рака легкого NCI-H1703 (фиг. 8Е), клеток немелкоклеточного рака легкого NCI-H1975 (фиг. 8F), клеток рака яичника PA-1 (фиг. 8G), клеток рака поджелудочной железы Hs700T (фиг. 8H), клеток рака предстательной железы DU145 (фиг. 8I) и клеток В-клеточной лимфомы Raji, отрицательных по В7-Н3 (фиг. 8J).

На фиг. 9 показаны результаты исследования способности В7-Н3-ADC по настоящему изобретению опосредовать цитотоксичность *in vivo* по отношению к опухолевым клеткам рака молочной железы MDA-MB-468, имплантированным в жировое тело молочной железы в модели на голых мышах CD1. Кривые роста опухоли представлены для мышей, обработанных внутривнутрибрюшинно 10 мг/кг chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE и chmAb-D-vc-MMAE или только одним носителем в день 25 (показано стрелкой).

На фиг. 10А-10С показаны результаты исследования способности В7-Н3-ADC по настоящему изобретению опосредовать цитотоксичность *in vivo* против подкожно имплантированных опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого NCI-H1703 NCI в модели на голых мышах CD1. Кривые роста опухолей представлены для мышей, которым вводили внутривнутрибрюшинно 10 мг/кг (фиг. 10А), 3 мг/кг (фиг. 1), 1 мг/кг (фиг. 10С) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-B-vc-MMAE и chmAb-B-vc-MMAE при 10 мг/кг или носитель отдельно в день 52 (показано стрелкой).

На фиг. 11А-11С показаны результаты исследования способности В7-Н3-ADC по настоящему изобретению опосредовать цитотоксичность *in vivo* против подкожно имплантированных опухолевых клеток рака яичника PA-1 в модели на голых мышах CD1. Кривые роста опухоли представлены для мышей, получавших внутривнутрибрюшинно 10 мг/кг (фиг. 11А), 3 мг/кг (фиг. 11В), 1 мг/кг (фиг. 5С) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE и chmAb-D-vc-MMAE при 10 мг/кг или носитель отдельно в день 42 (показано стрелкой).

На фиг. 12А-12С показаны результаты исследования способности В7-Н3-ADC по настоящему изобретению опосредовать цитотоксичность *in vivo* против подкожно имплантированных опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого Calu-6 в модели на голых мышах CD1. Кривые роста опухолей представлены для мышей, которым вводили внутривнутрибрюшинно 10 мг/кг (фиг. 12А), 3 мг/кг (фиг. 1), 1 мг/кг (фиг. 12С) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-B-vc-MMAE и chmAb-D-vc-MMAE при 10 мг/кг или носитель отдельно в день 20 (показано стрелкой).

На фиг. 13А-13С показаны результаты исследования способности В7-Н3-ADC по настоящему изобретению опосредовать цитотоксичность *in vivo* против подкожно имплантированных клеток меланомы А375.52 в модели на голых мышах CD1. Кривые роста опухолей представлены для мышей, которым вводили внутривнутрибрюшинно 10 мг/кг (фиг. 13 А), 3 мг/кг (фиг. 1), 1 мг/кг (фиг. 13С) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE и chmAb-D-vc-MMAE при 10 мг/кг или носитель отдельно в день 30 (показано стрелкой).

На фиг. 14А-14С показаны результаты исследования фармакокинетической стабильности молекул В7-Н3-ADC. Кривые концентрации антител в сыворотке представлены для всех антител (кружки) и интактного В7-Н3-ADC (квадраты), полученного из chmAb-B (фиг. 14А), chmAb-C (фиг. 14В) и chmAb-D (фиг. 14С).

На фиг. 15А-15С показано сохранение биологической активности посредством hmAb-C В7-Н3-ADC, имеющего типичный компонент дуокармицина (DUBA), связанный с аминокислотным остатком части Ab через расщепляемый линкер ("hmAb-C-DUBA"). Фиг. 15А клетки Calu-6; фиг. 15В, клетки NCI-H1703; фиг. 15С, клетки Hs700T. Контрольная молекула связывает CD20 и конъюгирована с DUBA ("Ctrl-DUBA").

На фиг. 16 показаны результаты исследования *in vivo* эффективности hmAb-C-DUBA на клетках немелкоклеточной карциномы легкого Calu-6. hmAb-C-DUBA вводили группам мышей (n = 5), которым подкожно инокулировали клетки немелкоклеточной карциномы легкого Calu-6. Дозы hmAb-C-DUBA (1 мг/кг × 3, 3 мг/кг × 3 или 6 мг/кг × 3) вводили внутривнутрибрюшинно мышам в дни 24, 31, 38 и 45 (показаны стрелками) после инокуляции, и животных оценивали по объему опухоли вплоть до 62 дней.

На фиг. 17 показаны результаты исследования *in vivo* эффективности hmAb-C-DUBA против клеток карциномы немелкоклеточного легкого Calu-6. hmAb-C-DUBA вводили в группы мышей (n = 7), которым подкожно инокулировали клетки немелкоклеточной карциномы легкого Calu-6. Дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (3 мг/кг или 10 мг/кг) вводили мышам на 20-й день (показано стрелкой) после инокуляции, а животных оценивали по объему опухоли вплоть до 55 дней.

На фиг. 18 показаны результаты *in vivo* исследования эффективности hmAb-C-DUBA против клеток карциномы яичника PA-1. hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA вводили в группы мышей (n = 6), которым подкожно инокулировали клетки карциномы яичника PA-1. Дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (3 мг/кг, 6 мг/кг или 10 мг/кг) вводили мышам в день 25 (показано стрелкой) после инокуляции, а животных

оценивали по объему опухоли вплоть до 60 дней.

На фиг. 19 показаны результаты исследования *in vivo* эффективности hmAb-C-DUBA против клеток меланомы A375.S2. hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA вводили группам мышей ($n = 7$), которым подкожно инокулировали клетки меланомы A375.S2. Дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (1 или 3 мг/кг) вводили мышам на 25-й день (показано стрелкой) после инокуляции, а животных оценивали по объему опухоли вплоть до 60 дней.

На фиг. 20A-20D показаны результаты *in vivo* исследования эффективности hmAb-C-DUBA против ксенотрансплантов в жировое тело клеток карциномы молочной железы MDA-MB468. hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA вводили внутрибрюшинно в группы мышей в дни 70, 74 и 78 после инокуляции клеток карциномы молочной железы MDA-MB468 в жировое тело молочной железы. Дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (либо разовая доза 3 мг/кг, либо 6 мг/кг) на 70-й день или три дозы 3 мг/кг в дни 70, 74 и 78 (показаны стрелками) была предоставлена после инокуляции, и животных оценивали по объему опухоли вплоть до 110 дней. На фиг. 20A показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 6 мг/кг (однократная доза). На фиг. 20B показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 3 мг/кг (однократная доза). На фиг. 20C показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 3 мг/кг (три дозы). На фиг. 20D показаны все результаты на одном графике.

На фиг. 21A-21D показаны результаты *in vivo* исследования эффективности hmAb-C-DUBA против подкожно имплантированных ксенотрансплантов клеток карциномы яичника PA-1. hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA вводили внутрибрюшинно (однократную дозу 3, 6 или 10 мг/кг) в день 24 после инокуляции или две дозы 10 мг/кг hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (на 24 и 28 дни после инокуляции) или четыре дозы 6 мг/кг hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (в дни 24, 28, 31 и 35 после инокуляции). Животных оценивали по объему опухоли в течение 70 дней. На фиг. 21A показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA при 10 мг/кг (однократная или двойная доза). На фиг. 21B показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA при 6 мг/кг (однократная или четырехкратная доза). На фиг. 21C показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 3 мг/кг (однократные дозы). На фиг. 21D показаны все результаты на одном графике.

На фиг. 22 показана фармакокинетика введения chmAb-C-DUBA у мышей. На чертеже показан общий IgG человека и интактный ADC chmAb-C-DUBA при 3 мг/кг ($n = 3$).

На фиг. 23A-23B показана фармакокинетика введения hmAb-C-DUBA у яванского макака. На чертежах показан общий IgG человека (фиг. 23A) и интактный ADC (фиг. 23B) hmAb-C-DUBA при 1 мг/кг (1 самец, 1 самка), 3 мг/кг (1 самец, 1 самка), 10 мг/кг (1 самец, 1 самка) или 27 мг/кг (2 самца, 2 самки)).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на новые В7-Н3-связывающие молекулы, способные связываться с В7-Н3 человеческой и нечеловеческой природы, и в частности с такими молекулами, которые являются перекрестно-реактивными с В7-Н3 приматов, отличных от человека (например, яванского макака). Изобретение дополнительно относится к В7-Н3-связывающим молекулам, которые включают вариабельные домены легкой цепи и/или вариабельные домены тяжелой цепи (VH), которые были гуманизированы и/или деиммунизированы так, чтобы они проявляли сниженную иммуногенность при введении объектам-реципиентам. Изобретение, в частности, относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим В7-Н3-связывающим молекулам, включая биспецифические диатела, BiTE, биспецифические антители, трехвалентные связывающие молекулы и т.д. которые включают: (i) такие В7-Н3-связывающие вариабельные домены и (ii) домен, способный связываться с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают любую из таких В7-Н3-связывающих молекул, и к способам, связанным с применением любой из таких В7-Н3-связывающих молекул при лечении рака и других заболеваний и состояний. Изобретение также, в частности, относится к молекуле, которая включает домен, связывающий В7-Н3 человека из гуманизованного антителя против В7-Н3 человека, конъюгированного по меньшей мере с одним лекарственным компонентом ("В7-Н3-ADC"). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают такие В7-Н3-ADC, и к способам, связанным с применением любого из таких В7-Н3-ADC при лечении рака и других заболеваний и состояний.

Настоящее изобретение также относится к молекуле, которая включает домен, связывающий В7-Н3 человека, из гуманизованного антителя против В7-Н3 человека, конъюгированного по меньшей мере с одним лекарственным компонентом ("В7-Н3-ADC"). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые включают такие В7-Н3-ADC, и к способам, связанным с применением любого из таких В7-Н3-ADC при лечении рака и других заболеваний и состояний.

Молекулы В7-Н3-ADC по настоящему изобретению включают формулу



где Ab представляет собой антитело, которое связывается с В7-Н3, которое включает гуманизованный вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и гуманизированный вариабельный домен легкой цепи (VL) или является его В7-Н3-связывающим фрагментом; и

D представляет собой цитотоксический лекарственный компонент;

LM представляет собой связь или линкерную молекулу, которая ковалентно связывает Ab и D;

m представляет собой целое число от 0 до n и обозначает количество линкерных молекул в B7-H3-ADC;

n представляет собой целое число от 1 до 10 и обозначает количество цитотоксических лекарственных компонентов, ковалентно связанных с молекулой B7-H3-ADC.

I. Антитела и их связывающие домены.

Антитела по настоящему изобретению представляют собой молекулы иммуноглобулина, способные специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д. по меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в варибельном домене молекулы иммуноглобулина. Молекулы B7-H3-ADC по настоящему изобретению, таким образом, включают антитело, которое связывается с B7-H3, или B7-H3-связывающий фрагмент. Используемые в данном документе термины "антитело" и "антитела" относятся к моноклональным антителам, мультиспецифическим антителам, человеческим антителам, гуманизированным антителам, синтетическим антителам, химерным антителам, поликлональным антителам, камелизированным антителам, одноцепочечным Fv (scFv), одноцепочечным антителам, Fab-фрагментам, F(ab')-фрагментам, дисульфидсвязанным биспецифическим Fv (sdFv), интрателам и эпитопсвязывающим фрагментам любого из вышеуказанных. В частности, термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулина, т.е. молекулы, которые включают сайт, связывающий эпитоп. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса. Антитела способны "иммуноспецифически связываться" с полипептидом или белком или небелковой молекулой (или связываться с такой молекулой "иммуноспецифическим образом") из-за присутствия на такой молекуле определенного домена или фрагмента или конформации ("эпитопа"). Эпитопсодержащая молекула может иметь иммуногенную активность, так что она вызывает реакцию продуцирования антитела у животного; такие молекулы называются "антигенами". В последние несколько десятилетий наблюдается возрождение интереса к терапевтическому потенциалу антител, и антитела стали одним из ведущих классов лекарственных средств, полученных с помощью биотехнологии (Chan, CE et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Более 200 лекарственных средств на основе антител были одобрены для применения или находятся в стадии разработки.

При использовании в данном документе, антитело, диатело или другая эпитопсвязывающая молекула, согласно сообщениям, "иммуноспецифически" связывает область другой молекулы (т.е. эпитоп), если она реагирует или ассоциируется чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с этим эпитопом относительно альтернативных эпитопов. Например, антитело, которое иммуноспецифически связывается с вирусным эпитопом, представляет собой антитело, которое связывает этот вирусный эпитоп с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно иммуноспецифически связывается с другими вирусными эпитопами или невирусными эпитопами. Также понятно, прочитав это определение, что, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое иммуноспецифически связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Таким образом, "иммуноспецифическое связывание" необязательно требует (хотя и может включать) исключительного связывания. Как правило, но необязательно, ссылка на связывание означает "иммуноспецифическое" связывание. Сообщается, что две молекулы способны связываться друг с другом "физиоспецифическим" образом, если такое связывание проявляет специфичность, с которой рецепторы связываются с их соответствующими лигандами.

Термин "моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, где моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе или не встречающихся в природе), которые участвуют в селективном связывании антигена. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными против одного эпитопа (или антигенного сайта). Термин "моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и т.д.), одноцепочечные (scFv) связывающие молекулы, их мутанты, гибридные белки, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, которые включают сайт распознавания антигена требуемой специфичности и имеют способность связываться с антигеном. Термин не предназначен для ограничения в отношении источника антитела или способа его получения (например, с помощью гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше под определением "антитело". Способы получения моноклональных антител известны в данной области. Одним из способов, который может быть использован, является способ Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497 или его модификация. Обычно моноклональные антитела вырабатывают в мышах, крысах или кроликах. Антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые включают искомым эпитоп. Иммуноген может представлять собой, без ограничения указанным, первичные клетки, культивируемые клеточные линии, раковые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань.

Клетки, используемые для иммунизации, могут культивироваться в течение периода времени (например, по меньшей мере 24 ч) до их применения в качестве иммуногена. Клетки могут быть использованы в качестве иммуногенов сами по себе или в сочетании с неденатурирующим адьювантом, таким как Ribi (см., например, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production", ILAR J. 37 (3): 119-125). Как правило, клетки должны быть сохранены интактными и предпочтительно должны быть жизнеспособными при использовании в качестве иммуногенов. Интактные клетки могут позволить антигенам лучше детектироваться иммунизированными животными, чем в случае антигенов поврежденных клеток. Применение денатурации или жестких адьювантов, например адьюванта Фрейда, может привести к разрыву клеток и, следовательно, не рекомендуется. Иммуноген можно вводить несколько раз с периодическими интервалами, такими как, дважды в неделю или еженедельно, или может вводиться таким образом, чтобы поддерживать жизнеспособность у животного (например, в тканевом рекомбинанте). В ином случае, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифическими для искомого патогенного эпитопа, могут быть секвенированы и получены рекомбинантно любыми способами, известными в данной области. В одном воплощении такое антитело секвенировано и полинуклеотидная последовательность затем клонируется в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая антитело, может поддерживаться в векторе в клетке-хозяине, и затем клетка-хозяин может быть размножена и заморожена для будущего использования. Полинуклеотидную последовательность таких антител можно использовать для генетической манипуляции для получения моноспецифических или мультиспецифических (например, биспецифических, триспецифических и тетраспецифических) молекул по изобретению, а также оптимизированного средства, химерного антитела, гуманизированного антитела и/или канинизированного антитела, для улучшения аффинности или других характеристик антитела. Общий принцип гуманизации антитела включает сохранение основной последовательности антигенсвязывающей части антитела, с заменой при этом нечеловеческого остатка антитела на последовательности человеческих антител.

Природные антитела (такие как антитела IgG) состоят из двух "легких цепей" в комплексе с двумя "тяжелыми цепями". Каждая легкая цепь содержит переменный домен ("VL") и константный домен ("CL"). Каждая тяжелая цепь содержит переменный домен ("VH"), три константных домена ("CH1", "CH2" и "CH3") и "шарнирный" участок ("H"), расположенный между доменами CH1 и CH2. Таким образом, основной структурной единицей природных иммуноглобулинов (например, IgG) является тетрамер, имеющий две легкие цепи и две тяжелые цепи, обычно экспрессируемые в виде гликопротеина около 150 000 Да. Аминоконцевая ("N-концевая") часть каждой цепи включает переменный домен, содержащий от 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая ("C-концевая") часть каждой цепи определяет константный участок, причем легкие цепи имеют один константный домен, а тяжелые цепи, обычно имеют три константных домена и шарнирный домен. Таким образом, структура легких цепей молекулы IgG представляет собой n-VL-CL-с, а структура тяжелых цепей IgG представляет собой n-VH-CH1-H-CH2-CH3-с (где n и с представляют, соответственно, N-конец и C-конец полипептида).

А. Характеристики переменных доменов антител.

Переменные домены молекулы IgG состоят из участков, определяющих комплементарность ("CDR"), которые включают остатки, контактирующие с эпитопом и не-CDR сегменты, называемые каркасными фрагментами ("FR"), которые в целом поддерживают структуру и определяют расположение петель CDR, чтобы обеспечить указанный контакт (хотя некоторые каркасные остатки также могут контактировать с антигеном). Таким образом, VL- и VH-домены имеют структуру n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C. Полипептиды, которые являются (или могут служить) первым, вторым и третьим CDR легкой цепи антитела, обозначены соответственно как: домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3}. Аналогично, полипептиды, которые (или могут служить) как первый, второй и третий CDR тяжелой цепи антитела, обозначены соответственно как домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}. Таким образом, термины домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2}, домен CDR_{L3}, домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} относятся к полипептидам, которые при включении в белок приводят к тому, что этот белок может связываться с определенным эпитопом независимо от того, является ли такой белок антителом, имеющим легкие и тяжелые цепи, или является диателом или одноцепочечной связывающей молекулой (например, scFv, BiTe и т.д.) или является другим типом белка. Соответственно, при использовании в данном документе, термин "эпитопсвязывающий фрагмент" обозначает фрагмент молекулы, способной к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом. Эпитопсвязывающий фрагмент может содержать любое из числа 1, 2, 3, 4 или 5 доменов CDR антитела или может содержать все 6 доменов CDR антитела и, хотя он способен иммуноспецифически связываться с таким эпитопом, может проявлять иммуноспецифичность, аффинность или селективность по отношению к эпитопу, который отличается от эпитопа такого антитела. Однако предпочтительно, чтобы эпитопсвязывающий фрагмент содержал все 6 доменов CDR такого антитела. Эпитопсвязывающий фрагмент антитела может быть одной полипептидной цепью (например, scFv) или может содержать две или более полипептидных цепей, каждая из которых имеет аминоконцев и карбоксильный конец (например, диатело, фрагмент Fab, фрагмент Fab₂ и т.д.). Если специально не указано, порядок доменов молекул белка, описанных в данном документе, приводится в направлении "N-

конец-С-конец".

Изобретение, в частности, относится к одноцепочечным переменным фрагментам ("scFv"), содержащим гуманизированный анти-В7-Н3-VL и/или домен VH настоящего изобретения, а также к мультиспецифическим связывающим молекулам, содержащим их. Одноцепочечные переменные фрагменты содержат домены VL и VH, которые связаны друг с другом с помощью короткого "линкерного" пептида. Такие линкеры могут быть модифицированы для обеспечения дополнительных функций, например, для обеспечения прикрепления лекарственного средства или для прикрепления к твердой подложке. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантно, либо синтетически. Для синтетического продуцирования scFv может использоваться автоматизированный синтезатор. Для рекомбинантного продуцирования scFv, подходящая плазмида, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, либо прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющие интерес scFv, могут быть получены с помощью обычных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен с применением стандартных методов очистки белка, известных в данной области.

Изобретение также, в частности, охватывает CDR_{H1}, CDR_{H2}, CDR_{H3}, CDR_{L1}, CDR_{L2}, CDR_{L3} или домен VL и/или домен VH гуманизированных вариантов В7-Н3-антител изобретения, а также мультиспецифические связывающие молекулы, содержащие то же самое. Термин "гуманизированное" антитело относится к гибридной молекуле, обычно полученной с применением рекомбинантных методик, имеющей эпитопсвязывающий сайт иммуноглобулина из видов, не являющихся человеком, и остальную структуру иммуноглобулиновой молекулы, которая основана на структуре и/или последовательности человеческого иммуноглобулина. Анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению, в частности, включают гуманизированные, гибридные или канинизированные варианты антител mAb-A, mAb-B, mAb-C или mAb-D. Полинуклеотидная последовательность переменных доменов таких антител может быть использована для генетической манипуляции с целью получения таких производных и улучшения аффинности или других характеристик таких антител. Общий принцип гуманизации антитела включает сохранение основной последовательности эпитопсвязывающей части антитела, при замене нечеловеческого остатка антитела на последовательности антитела человека. Существует четыре общих стадии гуманизации моноклонального антитела. Это: (1) определение нуклеотидной и спрогнозированной аминокислотной последовательности исходных переменных доменов легких и тяжелых цепей антитела, (2), конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, то есть решение о том, какой каркасный участок антитела будет использоваться процесса гуманизации или канинизации, (3) фактические методологии/методы гуманизации или канинизации, и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела; см., например, пат. США №№ 4816567; 5807715; 5866692 и 6331415.

Эпитопсвязывающий сайт может содержать либо полный переменный домен, объединенный с константными доменами, либо только участки, определяющие комплементарность (CDR) такого переменного домена, привитые в соответствующие каркасные области. Домены, связывающие эпитоп, могут быть дикого типа или модифицироваться одной или несколькими аминокислотными заменами. Это исключает константный участок в качестве иммуногена у людей, но оставляет возможность иммунного ответа на чуждый переменный домен (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Другой подход фокусируется не только на предоставлении константных участков человеческого происхождения, но и на изменении переменных доменов для того, чтобы как можно более точно изменить их на человеческую форму. Известно, что переменные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три области, определяющие комплементарность (CDR), которые изменяются в зависимости от рассматриваемых антигенов и определяют способность связывания, фланкированные четырьмя каркасными областями (FR), которые относительно консервативны у данных видов и которые предположительно обеспечивают поддерживающий каркас для CDR. Когда антитела нечеловеческого происхождения получают к определенному антигену, переменные домены могут быть "изменены" или "гуманизированы" путем прививки CDR, полученных из антител нечеловеческого происхождения, на FR, присутствующие в человеческом антителе, подлежащем модификации. Применение этого подхода к различным антителам сообщалось Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C.A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S.D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M.S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; and Co, M.S. et al. (1992) "Chi-

meric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", J. Immunol. 148:1149-1154. В некоторых воплощениях гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которое содержит все шесть CDR из мышинных антител). В других воплощениях гуманизированные антитела имеют один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), которые отличаются по последовательности от исходного антитела.

Было описано несколько молекул гуманизированного антитела, содержащих эпитопсвязывающий сайт, полученный из иммуноглобулина, отличного от человека, включая гибридные антитела, содержащие вариабельный домен из грызунов или модифицированный вариабельный домен из грызунов, и связанные с ними области, определяющие комплементарность (CDR), слитые с константными доменами человека (см., например, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies", Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen", J. Immunol. 138:4534-4538, and Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody", Cancer Res. 47:3577-3583). Другие источники описывают CDR грызунов, привитые в поддерживающую каркасную область (FR) человека перед слиянием с соответствующим константным доменом антител человека (см., например, Riechmann L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239:1534-1536; and Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse", Nature 321:522-525). В другом источнике описываются CDR грызунов, поддерживаемые рекомбинантно венерованными каркасными областями грызунов; см., например, Европейскую патентную публикацию № 519596. Эти "гуманизированные" молекулы предназначены для минимизации нежелательной иммунологической реакции на антительные молекулы грызунов против человеческого белка, которые ограничивают продолжительность и эффективность терапевтических применений этих фрагментов у реципиентов-людей. Другие способы гуманизации антител, которые также могут быть использованы, раскрыты Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins", Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476 и в пат. США №№ 6180377; 6054297; 5997867; и 5866692.

В. Характеристики константных доменов антитела.

1. Константные домены легкой цепи.

Как указано выше, каждая легкая цепь антитела содержит вариабельный домен ("VL") и константный домен ("CL").

Предпочтительным доменом CL является домен CL-каппа из IgG человека. Аминокислотной последовательностью типичного домена CL-каппа человека является (SEQ ID NO:1)

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG

NSQESVTEQD SKDSTYLSST TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNNGEC

В ином случае типичный домен CL является доменом CL лямбда из IgG человека. Аминокислотной последовательностью типичного домена CL лямбда человека является (SEQ ID NO:2)

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAHTVA WKADSSPVKA

GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWQSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

2. Константные домены тяжелой цепи.

Как указано выше, тяжелые цепи антитела могут содержать константные домены CH1, шарнирный домен, CH2 и CH3. Домены CH1 двух тяжелых цепей антительного комплекса с константной областью "CL" легкой цепи антитела прикреплены к доменам тяжелой цепи CH2 через промежуточный шарнирный домен.

Типичный домен CH1 является доменом CH1 из IgG1 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 из IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO:3)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Типичный домен CH1 является доменом CH1 из IgG2 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 из IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO:4)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Типичный домен CH1 является доменом CH1 из IgG3 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена человеческого IgG3 CH1 представляет собой (SEQ ID NO:5)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV

Типичный домен CH1 является доменом CH1 из IgG4 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 из IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGKT YTCNVNHKPS NTKVDKRV

Типичным шарнирным доменом является шарнирный домен из IgG1 человека. Аминокислотная последовательность типичного шарнирного домена из IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO:7): EPKSCDKTHTCPPCP.

Другим типичным шарнирным доменом является шарнирный домен из IgG2 человека. Аминокислотная последовательность типичного шарнирного домена из IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO:8): ERKCCVESCPCP.

Другим типичным шарнирным доменом является шарнирный домен из IgG3 человека. Аминокислотная последовательность типичного шарнирного домена из IgG3 человека представляет собой (SEQ ID NO:9):

ELKTLPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR SPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
SCDTPPPCPR CP

Другим типичным шарнирным доменом является шарнирный домен из IgG4 человека. Аминокислотная последовательность типичного шарнирного домена из IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO:10): ESKYGPPCPCP. Как описано в данном документе, шарнирный домен из IgG4 может включать стабилизирующую мутацию, такую как замена S228P. Аминокислотная последовательность типичного S228P-стабилизированного шарнирного домена из IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO:11): ESKYGPPCPCP.

Домены CH2 и CH3 двух тяжелых цепей антитела взаимодействуют с образованием "домена Fc", который является областью, которая распознается клеточными рецепторами Fc, включая, без ограничения указанным, рецепторы Fc гамма (FcγR). Используемый в данном документе термин "домен Fc" используется для определения C-концевой области тяжелой цепи IgG. Предполагается, что домен Fc относится к определенному изотипу IgG, классу или подклассу, если его аминокислотная последовательность наиболее гомологична этому изотипу относительно других изотипов IgG. В дополнение к их известным применениям в диагностике, антитела, как было показано, полезны в качестве терапевтических агентов.

В настоящем описании нумерация остатков в константной области тяжелой цепи IgG соответствует нумерации индекса EU, как в Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5TH ED. PUBLIC HEALTH SERVICE, NH1, MD (1991) ("KABAT"), явно включенного в данный документ ссылкой. Термин "индекс EU, как у Kabat" относится к нумерации константных доменов антитела IgG1 EU человека. Аминокислоты из переменных доменов зрелых тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов обозначаются положением аминокислоты в цепи. Kabat описал многочисленные аминокислотные последовательности для антител, идентифицировал аминокислотную консенсусную последовательность для каждой подгруппы и присвоил номер остатка каждой аминокислоте, а CDR идентифицировали, как определено Kabat (понятно, что CDR_{H1}, определенный в Chothia, C. & Lesk, AM ((1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", J. Mol. Biol. 196: 901-917) начинается на пять остатков ранее). Схема нумерации Kabat расширяется до антител, не включенных в его сборник, путем выравнивания рассматриваемого антитела с одной из консенсусных последовательностей в Kabat по отношению к консервативным аминокислотам. Этот способ присвоения номеров остатков стал стандартным в данной области и легко идентифицирует аминокислоты в эквивалентных положениях в разных антителах, включая гибридные или гуманизированные варианты. Например, аминокислота в положении 50 легкой цепи человеческого антитела занимает эквивалентное положение аминокислоты в положении 50 легкой цепи мышинового антитела.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG1 человека (SEQ ID NO:12)

231 240 250 260 270 280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
340 350 360 370 380
PIEKTISKAK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
390 400 410 420 430
WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
440 447
ALHNHYTQKS LSLSPG X

согласно нумерации по индексу EU, представленном у Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO:13)

231 240 250 260 270 280
 APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKTK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 440 447
 ALHNHYTQKS LSLSPG X

согласно нумерации по индексу EU, представленном у Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG3 человека представляет собой (SEQ ID NO:14)

231 240 250 260 270 280
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKTK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVME
 440 447
 ALHNRFTQKS LSLSPGX

согласно нумерации по индексу EU, представленном у Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO:15)

231 240 250 260 270 280
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVVSQED PEVQFNWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 340 350 360 370 380
 SIEKTISKAK GQPREPQVYV LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
 440 447
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

согласно нумерации по индексу EU, представленном у Kabat, где X является лизином (K) или отсутствует.

Полиморфизмы наблюдались в нескольких разных положениях в константных участках антитела (например, в положениях Fc, включая, без ограничения указанным, положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358, согласно нумерации по индексу EU, как указано у Kabat), и, таким образом, могут существовать небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями в известном уровне техники. Хорошо известны полиморфные формы иммуноглобулинов человека. В настоящее время известны 18 аллотипов Gm: G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a, x, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) или G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation". Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). В частности, предполагается, что антитела по настоящему изобретению могут включать любой аллотип, изоаллотип или гаплотип любого гена иммуноглобулина и не ограничены аллотипом, изоаллотипом или гаплотипом последовательностей, представленных в данном документе. Кроме того, в некоторых системах экспрессии С-концевой аминокислотный остаток (выделенный жирным шрифтом) домена CH3 может быть посттрансляционно удален. Соответственно, С-концевой остаток домена CH3 является необязательным аминокислотным остатком в молекулах, связывающих В7-Н3 (включая молекулы В7-Н3-ADC) по изобретению. В частности, объектом настоящего изобретения являются В7-Н3-связывающие молекулы (включая молекулы В7-Н3-ADC), лишённые С-концевого остатка домена CH3. Также в частности в настоящее изобретение включены такие конструкции, которые содержат С-концевой остаток лизина в домене CH3.

В традиционной иммунной функции взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит к широкому спектру ответов, от эффекторных функций, таких как антитело-зависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как регулирование пролиферации лимфоцитов и секреция антител. Все эти взаимодействия инициируются посредством связывания домена Fc антител или иммунных комплексов со специализированными клеточными рецепторами на кровяных клетках и, в частности, с рецепторами (в частности, называемыми "Fc-гамма-рецептором" "Fc γ R", и в совокупности "Fc γ Rs"), обнаруженными на поверхностях нескольких типов клеток иммунной системы (например, В-лимфоцитов, фолликулярных дендритных клеток, естественных киллеров, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и тучных клеток). Такие рецепторы имеют "внеклеточную" часть (которая, таким образом, способна лигировать с доменом Fc), "трансмембранную" часть (которая проходит через клеточную мембрану и "цитоплазматическую" часть (расположенную внутри клетки).

Разнообразие клеточных ответов вызванных антителами и иммунными комплексами является результатом структурной неоднородности трех Fc рецепторов: Fc γ RI (CD64), CD32A (Fc γ RIIA), Fc γ RIIB (CD32B), CD16A (Fc γ RIIIA) и CD16B (Fc γ RIIIB). Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32A) и Fc γ RIII (CD16) являются активирующими рецепторами, так что их лигирование с доменом Fc активирует иммунную систему или усиливает иммунный ответ. Напротив, Fc γ RIIB (CD32B) является ингибирующим рецептором; лигирование с доменом Fc ингибирует иммунный ответ или ослабляет существующий иммунный ответ. Кроме того, взаимодействие домена Fc с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) опосредует рециркуляцию молекул IgG из эндосомы на поверхность клетки и высвобождение в кровь. Аминокислотная последовательность примерных доменов Fc дикого типа IgG1 (SEQ ID NO:12), IgG2 (SEQ ID NO:13), IgG3 (SEQ ID NO:14) и IgG4 (SEQ ID NO:15) представлена выше.

CD16 является общим названием для активирующих рецепторов Fc, Fc γ RIIIA (CD16A) и Fc γ RIIIB (CD16B). CD16 экспрессируют нейтрофилы, эозинофилы, клетки-естественные киллеры (NK) и тканевые макрофаги, которые связывают агрегированный, но не мономерный IgG человека (Peltz, G.A. et al. (1989) "Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, And Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3): 1013-1017; Bachanova, V. et al. (2014) "NK Cells In Therapy Of Cancer", Crit. Rev. Oncog. 19(1-2): 133-141; Miller, J.S. (2013) "Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic", Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2013:247-253; Youinou, P. et al. (2002) "Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases" Autoimmun Rev. 1(1-2): 13-19; Peipp, M. et al. (2002) "Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells", Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511). Эти рецепторы связываются с Fc-частью антител IgG, тем самым вызывая высвобождение цитокинов. Если такие антитела связаны с антигеном чужеродных клеток (например, опухолевых клеток), то такое высвобождение опосредует убийство опухолевой клетки. Поскольку такое убийство является антителозависимым, то оно называется антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC).

CD32A (Fc γ RIIA) (Brandsma, A.M. (2015) "Fc Receptor Inside-Out Signaling And Possible Impact On Antibody Therapy", Immunol Rev. 268(1):74-87; van Sorge, N.M. et al. (2003) "Fcgamma Polymorphisms: Implications For Function, Disease Susceptibility And Immunotherapy", Tissue Antigens 61(3): 189-202; Selvaraj, P. et al. (2004) "Functional Regulation Of Human Neutrophil Fc Gamma Receptors", Immunol. Res. 29(1-3):219-230) и CD64 (Fc γ RI) (Lu, S. et al. (2015) "Structural Mechanism Of High Affinity Fc γ RI recognition Of Immunoglobulin G", Immunol. Rev. 268(1): 192-200; Swisher, J.F. et al. (2015) "The Many Faces Of Fc γ RI: Implications For Therapeutic Antibody Function", Immunol. Rev. 268(1): 160-174; Thepen, T. et al. (2009) "Fcgamma Receptor 1 (CD64), A Target Beyond Cancer", Curr. Pharm. Des. 15(23):2712-2718; Rouard, H. et al. (1997) "Fc Receptors As Targets For Immunotherapy", Int. Rev. Immunol. 16(1-2): 147-185) активируют рецепторы Fc, которые экспрессируются на макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах и дендритных клетках (и в случае CD32A, также на тромбоцитах и клетках Лангерганса). Напротив, CD32B (Fc γ RIIB) является ингибирующим Fc-рецептором на В-лимфоцитах (макрофагах, нейтрофилах и эозинофилах) (Storforth, RJ et al. (2016) "Regulation of Monoclonal Antibody Immunotherapy by Fc γ RIIB", J. Clin. Immunol. [2016 Feb 27 Epub], pp. 1-7; Bruhns, P. et al. (2009) "Specificity And Affinity Of Human Fcgamma Receptors And Their Polymorphic Variants For Human IgG Subclasses", Blood. 113(16):3716-3725; White, A.L. et al. (2014) "Fc γ RIIB As A Key Determinant Of Agonistic Antibody Efficacy", Curr. Top. Microbiol. Immunol. 382:355-372; Selvaraj, P. et al. (2004) "Functional Regulation Of Human Neutrophil Fc Gamma Receptors", Immunol. Res. 29(1-3):219-230).

Способность различных Fc γ R опосредовать диаметрально противоположные функции отражает их структурные различия, и, в частности, обладает ли Fc γ R иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом ("ITAM") или иммунорецепторным тирозиновым ингибирующим мотивом ("ITIM"). Рекрутирование различных цитоплазматических ферментов в эти структуры диктует результат опосредованных Fc γ R клеточных ответов. ITAM-содержащие Fc γ R включают Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA и активируют иммунную систему при связывании с доменами Fc (например, агрегированными доменами Fc, присутствующими в иммунном комплексе). Fc γ RIIB является единственным в настоящее время известным

природным ITIM-содержащим FcγR; он действует путем ослабления или ингибирования иммунной системы при связывании с агрегированными доменами Fc. Человеческие нейтрофилы экспрессируют ген FcγRIIA. Кластеризация FcγRIIA через иммунные комплексы или специфическое перекрестное связывание антителами служит для агрегации ITAM с рецептор-ассоциированными киназами, которые способствуют фосфорилированию ITAM. Фосфорилирование ITAM служит местом стыковки Syk-киназы, активация которой приводит к активации нижележащих субстратов (например, PI₃K). Клеточная активация приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов. Ген FcγRIIB экспрессируется на В-лимфоцитах; его внеклеточный домен на 96% идентичен FcγRIIA и связывает комплексы IgG неразличимым образом. Присутствие ITIM в цитоплазматическом домене FcγRIIB определяет этот ингибирующий подкласс FcγR. Недавно была установлена молекулярная основа этого ингибирования. При совместном лигировании с активирующим FcγR ITIM в FcγRIIB становится фосфорилированным и притягивает домен SH2 инозитполифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), который гидролизует мессенджер фосфоинозитол, высвобождаемый в результате активации тирозинкиназы, опосредованной ITAM-содержащим FcγR, следовательно, предотвращая приток внутриклеточного Ca⁺⁺. Таким образом, перекрестное сшивание FcγRIIB ослабляет активирующий ответ на лигирование FcγR, ингибирует клеточную реакцию и останавливает активацию В-клеток, в результате чего пролиферация В-клеток и секреция антитела прекращаются.

II. Биспецифические антитела, мультиспецифические диатела и диатела DART®.

Способность антитела связывать эпитоп антигена зависит от наличия и аминокислотной последовательности доменов антитела VL и VH. Взаимодействие легкой цепи и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействие его доменов VL и VH образует один из двух эпитопсвязывающих сайтов природного антитела, такого как IgG. Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопа (т.е. они моноспецифичны), хотя они могут связывать множество копий этого вида (т.е. проявлять бивалентность или мультивалентность).

Функциональность антител может быть повышена за счет получения мультиспецифичных молекул на основе антител, которые могут одновременно связывать два отдельных и отличающихся антигена (или различных эпитопов одного и того же антигена) и/или путем получения молекулы на основе антитела, имеющей более высокую валентность (т.е. более двух сайтов связывания) для того же эпитопа и/или антигена.

Для предоставления молекул, обладающих большими возможностями, чем природные антитела, был разработан широкий спектр форматов рекомбинантных биспецифических антител (см., например, публикации PCT №№ WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), большинство из которых используют линкерные пептиды либо для того, чтобы соединить дополнительный эпитопсвязывающий фрагмент (например, scFv, VL, VH и т.д.) с или внутри ядра антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) или соединить множество эпитопсвязывающих фрагментов (например, два Fab-фрагмента или scFv). Альтернативные форматы используют линкерные пептиды для слияния эпитопсвязывающего фрагмента (например, scFv, VL, VH и т.д.) с доменом димеризации, таким как домен CH2-CH3 или альтернативные полипептиды (WO 2005/070966, WO 2006/107786AWO 2006/107617A, WO 2007/046893). В публикациях PCT, опубликованных в публикациях WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172, раскрывается триспецифическое антитело, в котором домены CL и CH1 переключаются с их соответствующих естественных положений, а домены VL и VH были диверсифицированы (WO 2008/027236 WO 2010/108127), чтобы они могли связываться с более чем одним антигеном. В публикациях PCT №№ WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрывается модификация домена CH2, так, чтобы он содержал аддукт гибридного белка, включающий связывающий домен. В публикациях PCT WO 2010/028797, WO 2010028796 и WO 2010/028795 раскрыты рекомбинантные антитела, чьи домены Fc заменены дополнительными доменами VL и VH, чтобы образовать трехвалентные связывающие молекулы. В публикациях PCT № WO 2003/025018 и WO2003012069 раскрыты рекомбинантные диатела, чьи индивидуальные цепи, содержат домены scFv. В публикации PCT № WO 2013/006544 раскрыты многовалентные Fab-молекулы, которые синтезируются как одна полипептидная цепь, а затем подвергаются протеолизу с образованием гетеродимерных структур. Публикации PCT №№ WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрывают добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп к антителу или части антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела или добавление дополнительных доменов VL и VH в легкие и тяжелые цепи антитела, или добавления гетерологичного гибридного белка или связывания нескольких Fab-доменов друг с другом).

Кроме того, в данной области техники отмечается способность продуцировать диатела, которые отличаются от таких природных антител, способных связывать два или более различных видов эпитопов (т.е. проявлять биспецифичность или мультиспецифичность в дополнение к двухвалентной или многовалентной форме) (см., например, Holliger et al. (1993) "Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al); US

2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens et al); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Дизайн диатела основан на производном антитела, известном как одноцепочечный фрагмент вариабельного домена (scFv). Такие молекулы получают путем связывания вариабельных доменов легкой и/или тяжелой цепи с помощью короткого связывающего пептида. Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426) описывает пример связывания пептидов, которые соединяют приблизительно 3,5 нм между карбоксильным концом одного вариабельного домена и аминоконцом другого вариабельного домена. Были разработаны и использованы линкеры с другими последовательностями (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). В свою очередь, линкеры могут быть модифицированы для дополнительных функций, таких как прикрепление лекарственных средств или прикрепление к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантно, либо синтетически. Для синтетической выработки scFv может использоваться автоматизированный синтезатор. Для рекомбинантного продуцирования scFv подходящая плазмида, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как клетка дрожжей, растения, насекомого или млекопитающего, либо прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv, могут быть изготовлены обычными манипуляциями, такими как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен с применением стандартных способов очистки белка, известных в данной области.

Обеспечение биспецифических связывающих молекул (например, немоноспецифических диател) дает значительное преимущество перед антителами, включая, без ограничения указанным, "транс" связывающую способность, достаточную для совместного лигирования и/или совместной локализации различных клеток, которые экспрессируют различные эпитопы и/или "cis"-связывающую способность, достаточную для совместного лигирования и/или совместной локализации различных молекул, экспрессируемых одной и той же клеткой. Таким образом, биспецифические связывающие молекулы (например, немоноспецифические диатела) имеют широкое применение, включая терапию и иммунодиагностику. Биспецифичность обеспечивает большую гибкость в дизайне и разработке диатела в различных применениях, обеспечивая повышенную avidность к мультимерным антигенам, сшивание различных антигенов и направленное нацеливание на конкретные типы клеток, основанное на присутствии обоих целевых антигенов. Из-за их повышенной валентности, низких скоростей диссоциации и быстрого клиренса из кровотока (для небольших размеров, около или ниже ~ 50 кДа), молекулы диател, известные в данной области, также показали особое применение в области визуализации опухоли (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", Protein Eng. 10:1221-1225).

Способность продуцировать биспецифические диатела привела к их применению (в "транс") для совместного лигирования двух клеток вместе, например, путем совместного лигирования рецепторов, присутствующих на поверхности разных клеток (например, соединяющего цитотоксические Т-клетки с опухолевыми клетками) (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", Nature 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Альтернативно (или дополнительно) биспецифические (или три- или мультиспецифические) диатела могут использоваться (в *cis*) для совместного лигирования молекул, таких как рецепторы и т.д., которые присутствуют на поверхности одной и той же клетки. Совместное лигирование различных клеток и/или рецепторов полезно для модуляции эффекторных функций и/или передачи сигналов иммунной системы. Мультиспецифические молекулы (например, биспецифические диатела), содержащие сайты, связывающие эпитоп, могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной клетки, такой как CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д., которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, клетках естественных киллеров (NK), антигенпредставляющих клетках или других мононуклеарных клетках. В частности, эпитоп-связывающие сайты, направленные на рецептор клеточной поверхности, которые присутствуют в иммунных эффекторных клетках, полезны для генерации мультиспецифических связывающих молекул, способных опосредовать перенацеленное уничтожение клеток.

Однако вышеупомянутые преимущества имеют значительную цену. Формирование таких немоноспецифических диател требует успешной сборки двух или более различных и несходных полипептидов

(т.е. такое образование требует, чтобы диатела образовывались путем гетеродимеризации различных видов полипептидной цепи). Этот факт контрастирует с моноспецифическими диателами, которые образуются путем гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку по меньшей мере два разнородных полипептида (т.е. два вида полипептидов) должны быть предоставлены для образования немоноспецифического диатела, а также потому, что гомодимеризация таких полипептидов приводит к образованию неактивных молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588), получение таких полипептидов должно осуществляться таким образом, чтобы предотвратить ковалентное связывание между полипептидами одного вида (т.е., чтобы предотвратить гомодимеризацию) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588). Таким образом, в данной области сообщается о нековалентной ассоциации таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).

Однако в данной области признается, что биспецифические диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, являются неустойчивыми и легко диссоциируют на нефункциональные мономеры (см., например, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).

Столкнувшись с этой проблемой, в данной области удалось разработать стабильные, ковалентно связанные гетеродимерные немоноспецифические диатела, называемые диателами DART®; см., например, публ. пат. США №№ 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; европейские патентные публикации №№ EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и публ. PCT №№ WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; и Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells", *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD 123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform", *Blood pii: blood-2014-05-575704*; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates", *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449). Такие диатела содержат два или более ковалентно комплексированных полипептида и включают создание одного или нескольких остатков цистеина в каждом из используемых полипептидных соединений, которые позволяют образовывать дисульфидные связи и тем самым ковалентно связывать одну или несколько пар таких полипептидных цепей друг с другом. Например, было показано, что добавление остатка цистеина к С-концу таких конструкций позволяет осуществить дисульфидное связывание между включенными полипептидными цепями, стабилизирующими полученное диатело, без интерференции с характеристиками связывания диатела.

Много вариаций таких молекул было описано (см., например, публ. пат. США №№ 2015/0175697, 2014/0255407, 2014/0099318, 2013/0295121, 2010/0174053, 2009/0060910, 2007-0004909, публ. европейских пат. №№ EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221, EP 1868650 и публ. PCT №№ WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, WO 2006/113665) и приведено в данном документе.

Альтернативные конструкции известны в данной области для применений, в которых четырехвалентная молекула является предпочтительной, но Fc не требуется, включая, без ограничения указанным, четырехвалентные тандемные антитела, также называемые "TandAb" (см., например, публ. пат. США №№ 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263, европейские патентные публикации №№ EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 и EP 1293514; публ. PCT № WO 1999/057150, WO 2003/025018 и WO 2013/013700), которые образованы гомодимеризацией двух идентичных полипептидных цепей, каждая из которых обладает областью VH1, VL2, VH2 и VL2.

Недавно были описаны трехвалентные структуры, включающие два домена связывания по типу диатела и один домен не по типу диатела и домен Fc (см., например, публикации PCT №№ WO 2015/184207 и WO 2015/184203). Такие трехвалентные связывающие молекулы могут быть использованы для получе-

ния моноспецифических, биспецифических или триспецифических молекул. Возможность связывания трех различных эпитопов обеспечивает расширенные возможности.

III. В7-Н3 человека.

В7-Н3 человека существует как форма "4Ig" и как форма "2Ig". Аминокислотная последовательность типичной формы "4Ig" В7-Н3 человека (включая сигнальную последовательность из 29 аминокислотных остатков, показанную подчеркиванием) представлена в последовательности NCBI NP 001019907 (SEQ ID NO:16, сигнальная последовательность из 29 аминокислотных остатков показана подчеркиванием)

```
MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFLCTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQQNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQGD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
VPEDPVVALV GTDATLRCFSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
RDQGSAYANR TALFPDLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDVT ITCSSYRGP EAEVFWQDQG
GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQDDAH
GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEN
AGAEDQDQEG EGSKTALQPL KHSKEDDG QEIA
```

Аминокислотная последовательность "2Ig" формы В7-Н3 человека полностью охватывает форму "4Ig" В7-Н3 человека. Аминокислотная последовательность репрезентативной формы "2Ig" В7-Н3 человека (включая сигнальную последовательность из 29 аминокислотных остатков, показанную подчеркиванием) представлена в последовательности NCBI NP 079516 (SEQ ID NO:17)

```
MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFLCTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQQNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQGD AHGVTITGQ PMTFPEALW
VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEGSKTALQ
PLKHSKED DGQEIA
```

В некоторых воплощениях В7-Н3-связывающие молекулы (например, scFv, антитела, биспецифические диатела и т.д.) по изобретению характеризуются любыми одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью или девятью из следующих критериев:

- (1) способность иммуноспецифически связывать В7-Н3 человека, эндогенно экспрессируемого на поверхности раковой клетки;
- (2) специфически связывать В7-Н3 приматов, не являющихся человеком (например, В7-Н3 яванского макака);
- (3) специфически связывать В7-Н3 человека с равновесной константой связывания (K_D) 1 нМ или менее;
- (4) специфически связывать В7-Н3 приматов, не являющихся человеком, с равновесной константой связывания (K_D) 1 нМ или менее;
- (5) специфически связывать В7-Н3 человека со скоростью ассоциации (k_a) $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ или более;
- (6) специфически связывать В7-Н3 приматов, не являющихся человеком, со скоростью ассоциации (k_a) $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ или более;
- (7) специфически связывать В7-Н3 человека со скоростью диссоциации (k_d) $15 \times 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$ или менее;
- (8) специфически связывать В7-Н3 приматов, не являющихся человеком, со скоростью диссоциации (k_d) $15 \times 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$ или менее;
- (9) обладает способностью опосредовать перенацеленное уничтожение клеток (например, уничтожение раковых клеток, экспрессирующих В7-Н3).

Как описано в данном документе в другом месте, константы связывания В7-Н3-связывающей молекулы, могут быть определены с применением поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью анализа BIACORE®. Данные поверхностного плазмонного резонанса могут быть аппроксимированы к 1:1 модели связывания Ленгмюра (одновременно k_a k_d) и равновесная константа связывания K_D , может быть рассчитана из соотношения констант скоростей реакции k_d/k_a . Такие константы связывания могут быть определены для моновалентной молекулы В7-Н3-связывающей молекулы (т.е. молекулы, содержащей единственный В7-Н3-эпитопсвязывающий сайт), двухвалентной молекулы В7-Н3-связывающей молекулы (т.е. молекулы, содержащей два В7-Н3-эпитопсвязывающих сайта) или В7-Н3-связывающей молекулы, имеющие более высокую валентность (например, молекулы, содержащей три, четыре или более эпитопсвязывающих сайтов В7-Н3).

Используемый в данном документе термин "перенацеленное уничтожение клеток" относится к способности молекулы опосредовать убийство клетки-мишени (например, раковой клетки) путем локализа-

ции иммунной эффекторной клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и т.д.), в месте расположения клетки-мишени посредством связывания эпитопов, присутствующих на поверхностях таких эффекторных и клеток-мишеней, что приводит к уничтожению клетки-мишени. Способность В7-Н3-связывающей молекулы (например, биспецифической В7-Н3 x CD3-связывающей молекулы) опосредовать перенаправленную активность уничтожения клеток может быть определена с применением анализа цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Такие анализы хорошо известны в данной области, и предпочтительные анализы описаны ниже.

Настоящее изобретение, в частности, охватывает В7-Н3-связывающие молекулы (например, анти-тела, диатела, трехвалентные связывающие молекулы и т.д.), содержащие анти-В7-Н3 вариабельные домены (т.е. VL и/или VH-домены), которые иммуноспецифически связываются с эпитопом полипептида В7-Н3 человека. Если не указано иное, все такие В7-Н3-связывающие молекулы способны иммуноспецифически связываться с В7-Н3 человека. При использовании в данном документе, такие В7-Н3 вариабельные домены называются "анти-В7-Н3-VL" и "анти-В7-Н3-VH" соответственно.

IV. Мышечные антитела против В7-Н3 человека и их гуманизированные производные.

Из гибридомных клеток, которые были получены путем иммунизации клетками, экспрессирующими В7-Н3 человека, полипептидом В7-Н3 или его пептидным эпитопом, были выделены четыре типичных анти-В7-Н3 антитела, обозначенные как "mAb-A", "mAb-B", "mAb-C" и "mAb-D". Антитела "mAb-B", "mAb-C" и "mAb-D" были гуманизированы.

Было обнаружено, что антитела "mAb-C" и "mAb-D" являются перекрестно-реактивными с В7-Н3 яванского макака. Ниже приведены аминокислотные последовательности доменов VL и VH mAb-C и mAb-D. В одном воплощении предпочтительные связывающие молекулы против В7-Н3 человека настоящего изобретения обладают 1, 2 или всеми 3 CDR_H домена VH и/или 1, 2 или всеми 3 CDR_L домена VL, доменов VH и/или VL мышечного анти-В7-Н3-моноклонального антитела mAb-D, химерного моноклонального антитела mAb-D ("hmAb-D") или гуманизированного моноклонального антитела mAb-C или mAb-D ("hmAb-C" или "hmAb-D"). Такие предпочтительные связывающие молекулы против В7-Н3 человека включают биспецифические (или мультиспецифические) антитела, химерные или гуманизированные антитела, ViTe, диатела и т.д., и такие связывающие молекулы, имеющие варианты доменов Fc. Изобретение охватывает применение любых mAb-A, mAb-B, mAb-C или mAb-D для образования В7-Н3-связывающих молекул и, в частности, В7-Н3-ADC.

A. Мышечные антитела против В7-Н3 человека mAb-A.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL мышечного анти-В7-Н3 антитела, обозначенного как "mAb-A" (SEQ ID NO:95) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNV D TNVAWYQQKP GQSPKALIIYS

ASYRYSGVDP RFTGSGSGTD FTLTINNVS EDLAIEYFCQQ YNNYPPTFGS GTKLEIK

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH mAb-A (SEQ ID NO:96) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

DVQLVESGGG LVQPGRSRL SCAASGFTFS SEGMHWVWRA PEKGLEWVAY

ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYYCGRGR

ENIYYGSRDL YWGQGTTLTVSS

B. Мышечные антитела против В7-Н3 человека mAb-B.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL мышечного анти-В7-Н3 антитела, обозначенного как "mAb-B" (SEQ ID NO:97) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIIY

TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTIDNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из mAb-B (SEQ ID NO:98) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT

IYPGDGTRY TQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARRG

IPRLWYFDVW GAGTTTVSS

C. Гуманизированное антитело против В7-Н3 человека hmAb-B.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из hmAb-B (SEQ ID NO:99) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIIY

TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYFCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность CDR_{L1} из hmAb-B (RASQDISNYLN) (SEQ ID NO:100) может быть заменена альтернативным CDR_{L1}, имеющим аминокислотную последовательность RASQISSYLN (SEQ ID NO:101). Аналогично, аминокислотная последовательность CDR_{L2} из hmAb-B (YTSRLHS) (SEQ ID NO:102) может быть заменена альтернативным CDR_{L2}, имеющим аминокислотную последовательность YTSRLQS (SEQ ID NO:103).

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из hmAb-B (SEQ ID NO:104) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVWRA PGQGLEWMTG

IYPGDGTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG

IPRLWYFDVW GQGTTVSS

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность CDR_{H2} из hmAb-B (TYPG~~GD~~TRYTKF~~KG~~) (SEQ ID NO:105) может быть заменена альтернативным CDR_{H2}, имеющим аминокислотную последовательность: TYPGGDTRYTKF~~QG~~ (SEQ ID NO:106).

D. Мышиное антитело против B7-H3 человека mAb-C.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL мышинового анти-B7-H3 антитела, обозначенного как "mAb-C" (SEQ ID NO:18) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN
TKTLPEGVPS RFGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYCQH HYGTPPWTFG GGTNLEIK

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из mAb-C (SEQ ID NO:19) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYCARHD
GGAMDYWGQG TSVTVSS

E. Гуманизированное антитело против B7-H3 человека hmAb-C.

Варибельные домены анти-B7-H3 антитела mAb-C были гуманизированы. В некоторых случаях были созданы альтернативные гуманизированные варибельные домены для оптимизации активности связывания и/или для удаления антигенных эпитопов и/или для удаления потенциально лабильных аминокислотных остатков.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из hmAb-C (SEQ ID NO:20) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCRASESIY SYLAWYQQKP GKAPKLLVYN
TKTLPEGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYGTPPWTFG QGTRLEIK

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из hmAb-C (SEQ ID NO:21) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYCARHD
GGAMDYWGQG TTVTVSS

F. Мышиное антитело против B7-H3 человека mAb-D.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL мышинового анти-B7-H3 антитела, обозначенного как "mAb-D" (SEQ ID NO:22) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVDT TNVAWYQQKQ GHSPEALYS
ASYRYSGVPA RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGG GTKLEIK

Аминокислотная последовательность домена CDR_{L1} из mAb-D представляет собой (SEQ ID NO:23): KASQNVDTNVA.

Аминокислотная последовательность домена CDR_{L2} из mAb-D представляет собой (SEQ ID NO:24): SASYRYS.

Аминокислотная последовательность домена CDR_{L3} из mAb-D представляет собой (SEQ ID NO:25): QQYNNYPFT.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из mAb-D (SEQ ID NO:26) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

DVQLAESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLSL LQMTSLRSED TAMYCARHG
YRYEGEDYWG QGTTLVSS

Аминокислотная последовательность домена CDR_{H1} из mAb-D представляет собой (SEQ ID NO:27): SFGMH.

Аминокислотная последовательность домена CDR_{H2} из mAb-D представляет собой (SEQ ID NO:28): YISSGSGTIYYADTVKG.

Аминокислотная последовательность домена CDR_{H3} из mAb-D представляет собой (SEQ ID NO:29): HGYRYEGFDY.

G. Гуманизированное антитело против B7-H3 человека mAb-D.

Варибельные Домены анти-B7-H3 антитела mAb-D были гуманизированы. В некоторых случаях были созданы альтернативные гуманизированные варибельные домены для оптимизации активности связывания и/или для удаления антигенных эпитопов и/или для удаления потенциально лабильных аминокислотных остатков.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из hmAb-D (SEQ ID NO:30) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQSPSF LSASVGDVRT ITCASQNVDT TNVAWYQQKP GKAPKALIS
ASYRYSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGG GTKLEIK

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из hmAb-D (SEQ ID NO:31) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYCARHG
YRYEGEDYWG QGTTLVSS

V. Химерные антигенные рецепторы.

B7-H3-связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими од-

ноцепочечными молекулами, такими как одноцепочечные варибельные фрагменты ("анти-B7-H3-scFv") или химерные антигенные рецепторы ("ати-B7-H3-CAR"). Как обсуждалось выше, scFv создаются путем связывания варибельных доменов легкой и тяжелой цепей вместе с помощью короткого связывающего пептида. Первоначальные CAR обычно имели внутриклеточный домен из CD3 ζ -цепи, который является основным передатчиком сигналов от эндогенных TCR. CAR второго поколения обладают дополнительными внутриклеточными сигнальными доменами из различных костимулирующих белковых рецепторов (например, CD28, 41BB, ICOS и т.д.), присоединенных к цитоплазматическому хвосту CAR для того, чтобы обеспечить дополнительные сигналы Т-клетке. CAR третьего поколения объединяют несколько сигнальных доменов, таких как CD3z-CD28-41BB или CD3z-CD28-OX40, для дальнейшего повышения активности (Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor", Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells", Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia", Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo", Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62).

Анти-B7-H3-CAR по настоящему изобретению содержат анти-B7-H3-scFv, слитые с внутриклеточным доменом рецептора. Варибельные домены легкой цепи и тяжелой цепи ати-B7-H3-scFv предпочтительно представляют собой hmAb-C VL (SEQ ID NO:20) и hmAb-C VH (SEQ ID NO:21) или представляют собой предпочтительно hmAb-D VL (SEQ ID NO:30) и hVH из mAb-D (SEQ ID NO:31).

Внутриклеточный домен анти-B7-H3-CAR по настоящему изобретению предпочтительно выбран из внутриклеточного домена любого из 41BB-CD3 ζ , b2c-CD3 ζ , CD28, CD28-4-1BB-CD3 ζ , CD28-CD3 ζ , CD28 -Fc ϵ RI γ , CD28mut-CD3z, CD28-OX40-CD3z, CD28-OX40-CD3z, CD3z, CD4-CD3z, CD4-FcRRI, CD8-CD3z, Fc ϵ RI γ , FcRRIyAAIX, херегулин-CO3 \wedge , IL-13-CD3C или Ly49H-CD3z (Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD 123-Specific Chimeric Antigen Receptor" Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells" Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia", Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo" Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62).

VI. Мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы.

Настоящее изобретение также направлено на мультиспецифические (например, биспецифические, триспецифические и т.д.). B7-H3-связывающие молекулы, содержащие эпитопсвязывающий сайт (предпочтительно содержащий 1, 2 или все 3 домена CDR_H из домена VH против B7-H3 по изобретению и/или 1, 2 или все 3 домена CDR_L из домена VL против B7-H3 по изобретению или такой домен VH против B7-H3 и/или такой домен VL против B7-H3) и дополнительно содержащие второй эпитопсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается со вторым эпитопом, где такой второй эпитоп представляет собой: (i) другой эпитоп B7-H3 или (ii) эпитоп молекулы, которая не является B7-H3. Такие мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы предпочтительно содержат комбинацию сайтов, связывающих эпитоп, которые распознают множество антигенов, уникальных для клеток-мишеней или типа ткани. В частности, настоящее изобретение относится к мультиспецифическим B7-H3-связывающим молекулам, которые способны связываться с эпитопом B7-H3 и эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки, особенно Т-лимфоцита, естественного киллера (NK) или других мононуклеарных клеток. Например, такие B7-H3-связывающей молекулы по настоящему изобретению могут быть сконструированы так, чтобы содержать эпитопсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD2, CD3, CD8, CD 16, Т-клеточным рецептором (TCR) или NKG2D.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к биспецифическим B7-H3-связывающим молекулам, которые способны связываться с "первым эпитопом" и "вторым эпитопом", причем такие эпитопы не являются идентичными друг другу. Такие биспецифические молекулы содержат домены "VL1"/"VH1", которые способны связываться с первым эпитопом и домены "VL2"/"VH2", которые способны связываться со вторым эпитопом. Обозначения "VL1" и "VH1" указывают, соответственно, на варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи, которые связывают "первый" эпитоп таких биспецифических молекул. Точно так же обозначения "VL2" и "VH2" соответственно, указывают на варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи, которые связывают "второй" эпитоп таких биспецифических молекул. Не имеет значения, обозначен ли конкретный эпитоп первым и вторым эпитопом; причем такие обозначения имеют отношение только к наличию и ориентации доменов полипептидных цепей связывающих молекул по настоящему изобретению. В одном воплощении один из таких эпитопов представляет собой эпитоп B7-H3 человека, а другой представляет собой

другой эпитоп В7-Н3 или представляет собой эпитоп молекулы, которая не является В7-Н3. В конкретных воплощениях один из таких эпитопов представляет собой эпитоп В7-Н3 человека, а другой представляет собой эпитоп молекулы (например, CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточного рецептора (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующие на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, клетка естественный киллер (NK) или другая моноклеарная клетка. В некоторых воплощениях биспецифическая молекула содержит более двух эпитопсвязывающих сайтов. Такие биспецифические молекулы связывают по меньшей мере один эпитоп В7-Н3 и по меньшей мере один эпитоп молекулы, не являющийся В7-Н3, и могут дополнительно связывать дополнительные эпитопы В7-Н3 и/или дополнительные эпитопы молекулы, которая не является В7-Н3.

Настоящее изобретение, в частности, относится к биспецифическим, триспецифическим и мультиспецифическим В7-Н3-связывающим молекулам (например, биспецифическим антителам, биспецифическим диателам, трехвалентным связывающим молекулам и т.д.), которые обладают эпитопсвязывающими фрагментами антител (например, доменами VL и VH), которые позволяют им иметь возможность координировать связь по меньшей мере с одним эпитопом В7-Н3 и по меньшей мере с одним эпитопом второй молекулы, которая не является В7-Н3. Выбор доменов VL и VH полипептидных доменов таких молекул координируется таким образом, что полипептидные цепи, которые образуют такие мультиспецифические В7-Н3-связывающие молекулы, собираются для образования по меньшей мере одного функционального эпитопсвязывающего сайта, который специфичен по меньшей мере для одного эпитопа В7-Н3 и по меньшей мере одного функционального эпитопсвязывающего сайта, который специфичен по меньшей мере для одного эпитопа молекулы, которая не является В7-Н3. Предпочтительно, чтобы мультиспецифические В7-Н3-связывающие молекулы содержали 1, 2 или все 3 CDR_H домена VH против В7-Н3 по изобретению и/или 1, 2 или все 3 CDR_L домена VL против В7-Н3 изобретения, или такой домен VH против В7-Н3 и/или такой домен VL против В7-Н3, как предусмотрено в настоящем документе.

А. Биспецифические антитела.

Настоящее изобретение охватывает биспецифические антитела, способные одновременно связываться с эпитопом В7-Н3 и эпитопом молекулы, которая не является В7-Н3. В некоторых воплощениях биспецифическое антитело, способное одновременно связываться с В7-Н3 и второй молекулой, которая не является В7-Н3, получают с применением любого из способов, описанных в публикациях PCT WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO 02010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873 и WO 2014/022540, каждая из которых включена в настоящее описание ссылкой во всей своей полноте.

В. Биспецифические диатела, утратившие домены Fc.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к биспецифическим диателам, которые способны связываться с первым эпитопом и вторым эпитопом, причем первый эпитоп является эпитопом В7-Н3 человека, а второй является эпитопом молекулы, которая не является В7-Н3, предпочтительно молекулы (например, CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующей на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, клетка естественный киллер (NK) или другая моноклеарная клетка. Такие диатела содержат и наиболее предпочтительно состоят из первой полипептидной цепи и второй полипептидной цепи, последовательности которых позволяют полипептидным цепям ковалентно связываться друг с другом с образованием ковалентно ассоциированного диатела, которое способно одновременно связываться с эпитопом В7-Н3 и вторым эпитопом.

Первая полипептидная цепь такого воплощения биспецифических диател включает в направлении от N-конца к С-концу: N-конец домена VL моноклонального антитела, способного связываться с первым или вторым эпитопом (т.е. либо VL_{-анти-В7-Н3-VL} либо VL_{-эпитоп2}), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способный связываться со вторым эпитопом (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{-анти-В7-Н3-VL}) или В7-Н3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{-эпитоп2}), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий остаток цистеина, домен, стимулирующий гетеродимеризацию, и С-конец (фиг. 1).

Вторая полипептидная цепь этого воплощения биспецифических диател включает в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с первым или вторым эпитопом (т.е. либо VL_{-анти-В7-Н3-VL}, либо VL_{-эпитоп2}, являющийся доменом VL, не выбранным для включения в первую полипептидную цепь диатела), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связывать либо второй эпитоп (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{-анти-В7-Н3-VL}), либо В7-Н3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{-эпитоп2}), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий цистеиновый остаток, домен, способствующий гетеродимеризации, и С-конец (фиг. 1).

Домен VL первой полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH второй полипептидной цепи с образованием первого функционального эпитопсвязывающего сайта, который специфичен для первого антигена (т.е. либо В7-Н3, либо молекулы, которая включает второй эпитоп). Аналогично, домен VL

второй полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH первой полипептидной цепи, чтобы сформировать второй функциональный эпитопсвязывающий сайт, который специфичен для второго антигена (т.е. либо молекулы, которая включает второй эпитоп, либо B7-H3). Таким образом, выбор доменов VL и VH первой и второй полипептидных цепей координируется таким образом, что две полипептидные цепи диатела в совокупности содержат домены VL и VH, способные связываться как с эпитопом B7-H3, так и со вторым эпитоп (т.е. они в совокупности содержат VL-анти-B7-H3-VL/VH анти-B7-H3-VH и VL-эпитоп 2/VH-эпитоп 2).

Наиболее предпочтительно, чтобы длина промежуточного спейсерного пептида (т.е. "линкера 1", который разделяет такие домены VL и VH), была выбрана для существенного или полного предотвращения связывания VL- и VH-доменов полипептидной цепи друг с другом (например, состоящего из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислотных остатков промежуточного линкера). Таким образом, домены VL и VH первой полипептидной цепи по существу или полностью неспособны связываться друг с другом. Аналогично, Домены VL и VH второй полипептидной цепи по существу или полностью неспособны связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) имеет последовательность (SEQ ID NO:32): GGGSGGGG.

Длину и состав второго промежуточного спейсерного пептида ("линкера 2") выбирают на основе выбора одного или нескольких полипептидных доменов, которые способствуют такой димеризации (т.е. "домена, способствующего гетеродимеризации"). Как правило, второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) будет содержать 3-20 аминокислотных остатков. В частности, когда используемый домен(ы), способствующий гетеродимеризации, не содержит цистеиновый остаток, используется цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2). Цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) будет содержать 1, 2, 3 или более цистеинов. Предпочтительный цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) имеет последовательность GGCGGG (SEQ ID NO:33). В ином случае, линкер 2 не содержит цистеин (например, GGG, GGGS (SEQ ID NO:34), LGGGSG (SEQ ID NO:35), GGGSGGGGGG (SEQ ID NO:36), ASTKG (SEQ ID NO:37), LEPKSS (SEQ ID NO:38), APSSS (SEQ ID NO:39) и т.д.) и цистеинсодержащий домен, способствующих гетеродимеризации, как описано ниже. Необязательно, используются и цистеинсодержащий линкер 2, и цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации.

Домены, способствующие гетеродимеризации, могут представлять собой GVEPKSC (SEQ ID NO:40) или VEPKSC (SEQ ID NO:41) или AEPKSC (SEQ ID NO:42) на одной полипептидной цепи и GFNRGEC (SEQ ID NO:43) или FNRGEC (SEQ ID NO:42) ID NO: 44) на другой полипептидной цепи (US 2007/0004909).

В предпочтительном воплощении домены, способствующие гетеродимеризации, будут содержать тандемно повторяющиеся спиральные домены противоположного заряда, например, спиральные домены "E-спираль" (SEQ ID NO:45: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), чьи глутаматные остатки образуют отрицательный заряд при pH 7, и домены "K-спираль" (SEQ ID NO:46: KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE), чьи лизиновые остатки образуют положительный заряд при pH 7. Наличие таких заряженных доменов способствует ассоциации между первым и вторым полипептидами и, таким образом, способствует образованию гетеродимера. Домены, способствующие гетеродимеризации, которые включают модификации описанных выше последовательностей E-спирали и K-спирали, могут включать один или несколько остатков цистеина. Наличие таких цистеиновых остатков позволяет спирали, присутствующей в одной полипептидной цепи, ковалентно связываться с дополнительной спиралью, присутствующей в другой полипептидной цепи, тем самым ковалентно связывая полипептидные цепи друг с другом и увеличивая стабильность диатела. Примеры таких особенно предпочтительных доменов, способствующих гетеродимеризации, включают модифицированную E-спираль, имеющую аминокислотную последовательность EVAASEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:47), и модифицированную K-спираль, имеющую аминокислотную последовательность KVAASCKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO:48).

Как раскрыто в WO 2012/018687, с целью улучшения фармакокинетических свойств диател *in vivo*, диатело может быть модифицировано для включения полипептидной части связываемого сывороткой белка на одном или нескольких концах диатела. Наиболее предпочтительно такая полипептидная часть сывороточного связывающего белка будет установлена на C-конце полипептидной цепи диатела. Альбумин является самым распространенным белком в плазме и имеет период полувыведения 19 дней у людей. Альбумин обладает несколькими узлами связывания малых молекул, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и тем самым продлевать период полувыведения в сыворотке. Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) протеина G штамма G148 *Streptococcus* состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный узел с тремя спиральями и обладающий широкой альбумин-связывающей специфичностью (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", *J. Biol. Chem.* 277(10):8114-8120. Таким образом, особенно предпочтительная полипептидная часть сывороточного связывающего белка для улучшения фармакокинетических свойств диатела *in vivo* представляет собой связывающий альбумин домен (ABD) из стрептококкового протеина G и более предпочтительно домен, связывающий альбумин 3 (ABD3) протеина G штамма *Streptococcus* G148 (SEQ ID NO:49): LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Как раскрыто в WO 2012/162068 (в данный документ включен ссылкой), "деиммунизированные" варианты SEQ ID NO:49 обладают способностью ослаблять или исключать связывание МНС класса II. Исходя из результатов комбинаторных мутаций, следующие комбинации замен считаются предпочтительными заменами для формирования такого деиммунизированного ABD: 66D/70S + 71A; 66S/70S + 71A; 66S/70S + 79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A + 66S; 64A/65A/71A + 66D; 64A/65A/71A + 66е; 64A/65A/79A + 66S; 64A/65A/79A + 66D; 64A/65A/79A + 66е. Варианты ABD, имеющие модификации L64A, I65A и D79A или модификации N66S, T70S и D79A. Вариант деиммунизированного ABD, имеющий аминокислотную последовательность

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:50),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:51),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:52),

особенно предпочтительны, так как такие деиммунизированные ABD демонстрируют, по существу, связывание дикого типа, обеспечивая при этом ослабленное связывание с МНС класса II. Таким образом, первая полипептидная цепь такого диатела, имеющего ABD, содержит третий линкер (линкер 3), предпочтительно расположенный на С-конце Е-спирального (или К-спирального) домена такой полипептидной цепи, с целью интервенции между Е-спиральным (или К-спиральным) доменом и ABD (который предпочтительно является деиммунизированным ABD). Предпочтительной последовательностью для такого линкера 3 является SEQ ID NO:34: GGGS.

С. Мультиспецифические диатела, содержащие домены Fc.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к мультиспецифическим диателам, способным одновременно связываться с эпитопом В7-Н3 и вторым эпитопом (т.е. с другим эпитопом В7-Н3 или эпитопом молекулы, которая не является В7-Н3), которые включают домен Fc. Добавление домена IgG CH2-CH3 в одну или обе из полипептидных цепей антитела, с которым комплексообразование цепей диатела приводит к образованию домена Fc, увеличивает биологический период полувыведения и/или изменяет валентность диатела. Такие диатела содержат две или более полипептидных цепей, последовательности которых позволяют полипептидным цепям ковалентно связываться друг с другом с образованием ковалентно связанного диатела, которое способно одновременно связываться с эпитопом В7-Н3 и вторым эпитопом. Включение доменов IgG CH2-CH3 в оба полипептида диатела позволит сформировать двухцепочечное биспецифическое диатело, содержащее Fc-участок (фиг. 2).

В ином случае, включение доменов CH2-CH3 из IgG только в один из полипептидов диатела позволит образовывать более сложное четырехцепочечное биспецифическое Fc-домен содержащее диатело (фиг. 3А-3С). На фиг. 3С показано типичное четырехцепочечное диатело, обладающее константным доменом легкой цепи (CL) и константным доменом тяжелой цепи CH1, однако в качестве альтернативы могут использоваться фрагменты таких доменов, а также другие полипептиды (см., например, фиг. 3А и 3В, публ. пат. США №№ 2013-0295121, 2010-0174053 и 2009-0060910, европ. пат. публ. №№ EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и публ. PCT №№ WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538). Так, например, вместо домена CH1 можно использовать пептид, имеющий аминокислотную последовательность GVEPKSC (SEQ ID NO:40), VEPKSC (SEQ ID NO:41) или AEPKSC (SEQ ID NO:42), полученный из шарнирной области человеческого IgG, а вместо домена CL можно использовать С-концевые 6 аминокислот легкой цепи каппа человека, GFNRGEC (SEQ ID NO:43) или FNRGEC (SEQ ID NO:44). Репрезентативное четырехцепочечное диатело, содержащее пептид, показано на фиг. 3А. В ином случае, или, кроме того, можно использовать пептид, содержащий тандемные спиральные домены противоположного заряда, такие как спиральные домены "Е-спираль" (SEQ ID NO:45: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK или SEQ ID NO:47: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); и домены "К-спираль" (SEQ ID NO:46: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE или SEQ ID NO:48: KVAASKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Репрезентативное четырехцепочечное диатело, содержащее спиральный домен, показано на фиг. 3В.

Молекулы, содержащие домен Fc, по настоящему изобретению, могут включать дополнительные промежуточные спейсерные пептиды (линкеры), как правило, такие линкеры будут включены между доменом, способствующим гетеродимеризации (например, Е-спиралью или К-спиралью) и доменом CH2-CH3 и/или между доменом CH2-CH3 и варибельным доменом (т.е. VH или VL). Как правило, дополнительные линкеры будут содержать 3-20 аминокислотных остатков и могут необязательно содержать всю или часть шарнирного домена IgG (предпочтительно цистеин-содержащую часть шарнирного домена IgG). Линкеры, которые могут быть использованы в биспецифических Fc-домен-содержащих молекулах диател по настоящему изобретению, включают GGGS (SEQ ID NO:34), LGGGSG (SEQ ID NO:35), GGGSGGGGGG (SEQ ID NO:36), ASTKG (SEQ ID NO:34) ID NO: 37), LEPKSS (SEQ ID NO:38), APSSS (SEQ ID NO:39), APSSSPME (SEQ ID NO:53), VEPKSADKTHTCPSP (SEQ ID NO:54), LEPKSADKTHTCPSP (SEQ ID NO:55), DKTHTCPSP (SEQ ID NO:56), GGC и GGG. LEPKSS (SEQ ID

NO:38) можно использовать вместо GGG или GGC для удобства клонирования. Кроме того, аминокислоты GGG или LEPKSS (SEQ ID NO:38) могут следовать сразу после DKТНТСРРСР (SEQ ID NO:56) с образованием альтернативных линкеров: GGGDKТНТСРРСР (SEQ ID NO:57); и LEPKSSDKТНТСРРСР (SEQ ID NO:58). Биспецифические Fc-домен-содержащие молекулы по настоящему изобретению могут включать шарнирный домен IgG в дополнение к или вместо линкера. Типичные шарнирные домены включают: EPKSCDKТНТСРРСР (SEQ ID NO:7) из IgG1, ERKCCVCEPPCP (SEQ ID NO:8) из IgG2, ESKYGPCCPSCP (SEQ ID NO:10) из IgG4 и ESKYGPCCPSCP (SEQ ID NO:11), вариант шарнира из IgG4, включающий стабилизирующую замену S228P (согласно нумерации в индексе EU, как указано в Kabat) для уменьшения обмена нитей.

Как показано на фиг. 3А-3С, Fc-домен-содержащие диатела изобретения могут включать четыре цепи. Первая и третья полипептидные цепи такого диатела включают три домена: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, (iii) домен, способствующий гетеродимеризации, и (iv) домен, содержащий CH2-CH3. Вторая и четвертая полипептидные цепи содержат: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, способствующий гетеродимеризации, где домены, способствующие гетеродимеризации, стимулируют димеризацию первой/третьей полипептидных цепей со второй/четвертой полипептидными цепями. Области VL и/или VH третьей и четвертой полипептидных цепей, а также домены VL и/или VH первой и второй полипептидных цепей могут быть одинаковыми или различными с тем, чтобы обеспечить четырехвалентное связывание, которое является моноспецифическим, биспецифическим или тетраспецифическим. Обозначения "VL3" и "VH3" обозначают соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связывают "третий" эпитоп такого диатела. Аналогично, обозначения "VL4" и "VH4" обозначают соответственно: переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связывают "четвертый" эпитоп такого диатела. Общая структура полипептидных цепей репрезентативных четырехцепочечных биспецифических Fc-домен-содержащих диател по изобретению представлена в табл. 1.

Таблица 1

Биспецифические	2- ^я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1- ^я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1- ^я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2- ^я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Тетраспецифические	2- ^я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1- ^я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3- ^я цепь	NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4- ^я цепь	NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH

HPD = Домен, способствующий гетеродимеризации.

В конкретном воплощении изобретения антигена по настоящему изобретению являются биспецифическими, четырехвалентными (т.е. обладают четырьмя эпитопсвязывающими сайтами) Fc-содержащими диателами, которые состоят из четырех полных полипептидных цепей (фиг. 3А-3С). Биспецифические, четырехвалентные, Fc-содержащие диатела по изобретению включают два эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифичных к В7-Н3 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом В7-Н3 или с различными эпитопами В7-Н3), и два эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифических ко второй молекуле (которая может быть способна связываться с одним и тем же эпитопом второй молекулы или с различными эпитопами второй молекулы). Предпочтительно, вторая молекула представляет собой молекулу (например, CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующую на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, естественный киллер (NK) или другая моноклеарная клетка.

В еще одном воплощении Fc-домен-содержащие диатела по настоящему изобретению, могут включать три полипептидные цепи. Первый полипептид такого диатела включает три домена: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид такого диатела включает: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, который способствует гетеродимеризации и ковалентной связи с первой полипептидной цепью диатела. Третий полипептид такого диатела включает последовательность CH2-CH3. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи такого диатела объединяются вместе с образованием эпитопсвязывающего сайта VL1/VH1, который способен связываться с первым антигеном (т.е. либо В7-Н3, либо молекулой, которая включает второй эпитоп), а также эпитопсвязывающий сайт VL2/VH2, который способен связываться со вторым антигеном (т.е. либо с молекулой, которая включает второй эпитоп, либо В7-Н3). Первый и второй полипептиды связаны друг с другом через дисульфидную связь, включающую цистеиновые остатки в их соответствующих третьих доменах. Примечательно, что первая и третья полипептидные цепи объединяются друг с другом с образованием домена Fc, который стабилизируется через дисульфидную связь. Такие биспецифические диатела обладают повышенной эффективностью. На фиг. 4А и 4В показаны структуры таких диател. Такие Fc-участок-содержащие диатела могут иметь одну из двух ориентаций (табл. 2).

Таблица 2

Первая ориентация	3- ^{-*} цепь	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1- ^{-*} цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	2- ^{-*} цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Вторая ориентация	3- ^{-*} цепь	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1- ^{-*} цепь	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD-COOH
	2- ^{-*} цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH

HPD = Домен, способствующий гетеродимеризации.

В конкретном воплощении изобретения антитела по настоящему изобретению являются биспецифическими, двухвалентными (т.е. обладают двумя эпитопсвязывающими сайтами) Fc-содержащими диателами, которые состоят из трех полных полипептидных цепей (фиг. 4А-4В). Биспецифические двухвалентные Fc-содержащие диатела по изобретению содержат один эпитопсвязывающий сайт, иммуноспецифичный к В7-Н3, и один эпитопсвязывающий сайт, иммуноспецифичный ко второй молекуле. Предпочтительно, вторая молекула представляет собой молекулу (например, CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующую на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, естественный киллер (NK) или другие мононуклеарные клетки.

В еще одном воплощении Fc-домен-содержащие диатела, могут содержать в общей сложности пять полипептидных цепей. В конкретном воплощении две из указанных пяти полипептидных цепей имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Первая полипептидная цепь такого диатела включает: (i) домен, содержащий VH1, (ii) содержащий CH1 домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Первой полипептидной цепью может быть тяжелая цепь антитела, которая включает VH1 и константную область тяжелой цепи. Вторая и пятая полипептидные цепи такого диатела включают: (i) домен, содержащий VL1, и (ii) домен, содержащий CL. Вторая и/или пятая полипептидные цепи такого диатела могут быть легкими цепями антитела, которые содержат VL1, комплементарный VH1 первой/третьей полипептидной цепи. Первую, вторую и/или пятую полипептидные цепи можно выделить из встречающегося в природе антитела. В ином случае, они могут быть сконструированы рекомбинантно. Третья полипептидная цепь такого диатела включает: (i) домен, содержащий VH1, (ii) домен, содержащий CH1, (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, (iv) домен, содержащий VL2, (v) домен, содержащий VH3, и (vi) домен, способствующий гетеродимеризации, где домены, способствующие гетеродимеризации, стимулируют димеризацию третьей цепи с четвертой цепью. Четвертый полипептид таких диател включает: (i) домен, содержащий VL3, (ii) домен, содержащий VH2, и (iii) домен, который способствует гетеродимеризации и ковалентной связи с третьей полипептидной цепью диатела.

Таким образом, первая и вторая, и третья и пятая полипептидные цепи таких диател связываются вместе с образованием двух эпитопсвязывающих сайтов VL1/VH1, способных связывать первый эпитоп. Третью и четвертую полипептидные цепи таких диател связывают вместе с образованием эпитопсвязывающего сайта VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом, а также сайта связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом. Первый и третий полипептиды связаны друг с другом через дисульфидную связь, включающую цистеиновые остатки в их соответствующих константных областях. Примечательно, что первая и третья полипептидные цепи образуют комплекс друг с другом для образования домена Fc. Такие мультиспецифические диатела обладают повышенной эффективностью. На фиг. 5 показана структура таких диател. Понятно, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут быть одинаковыми или различными для того, чтобы сделать возможным связывание, которое является моноспецифическим, биспецифическим или триспецифическим. Как указано в данном документе, эти домены предпочтительно выбирают таким образом, чтобы связывать эпитоп В7-Н3, эпитоп второй молекулы и необязательно эпитоп третьей молекулы.

Домены VL и VH полипептидных цепей выбирают так, чтобы образовались сайты связывания VL/VH, специфичные к искомому эпитопу. Сайты связывания VL/VH, образованные ассоциацией полипептидных цепей, могут быть одинаковыми или различными для того, чтобы обеспечить однохвалентное связывание, которое является моноспецифическим, биспецифическим, триспецифическим или тетраспецифическим. В частности, домены VL и VH могут быть выбраны таким образом, при котором мультивалентное диатело может включать два сайта связывания для первого эпитопа и два сайта связывания для второго эпитопа или три сайта связывания для первого эпитопа и один сайт связывания для второго эпитопа, или два сайта связывания для первого эпитопа, один сайт связывания для второго эпитопа и один сайт связывания для третьего эпитопа (как показано на фиг. 5). Общая структура полипептидных цепей репрезентативных пятицепочечных Fc-домен-содержащих диател по изобретению представлена в табл. 3.

Таблица 3

Биспецифические (2x2)	2-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	5-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL2-VH2-HPD-COOH
Биспецифический (3x1)	2-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	5-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Триспецифические (2x1x1)	2-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	5-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL3-VH2-HPD-COOH

HPD = Домен, способствующий гетеродимеризации.

В конкретном воплощении изобретения антитела по настоящему изобретению являются биспецифическими, четырехвалентными (т.е. обладают четырьмя эпитопсвязывающими сайтами) Fc-содержащими диателами, которые состоят из пяти полных полипептидных цепей, имеющих два эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифичных к B7-H3 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом B7-H3 или с различными эпитопами B7-H3) и двумя эпитопсвязывающими сайтами, специфичными ко второй молекуле (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом второй молекулы или с различными эпитопами второй молекулы). В другом воплощении биспецифические, четырехвалентные Fc-содержащие диатела по изобретению содержат три эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифических к B7-H3 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом B7-H3 или с двумя или тремя различными эпитопами B7-H3) и один эпитопсвязывающий сайт, специфичный к второй молекуле. В другом воплощении биспецифические, четырехвалентные Fc-содержащие диатела по изобретению содержат один эпитопсвязывающий сайт, иммуноспецифичный к B7-H3, и три эпитопсвязывающих сайта, специфичных ко второй молекуле (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом второй молекулы или двумя или тремя разными эпитопами второй молекулы). Как указано выше, домены VL и VH могут быть выбраны для разрешения триспецифического связывания. Соответственно, изобретение также охватывает триспецифические четырехвалентные Fc-содержащие диатела. Триспецифические четырехвалентные Fc-содержащие диатела по изобретению содержат два эпитопсвязывающих сайта, иммуноспецифичных к B7-H3, один эпитопсвязывающий сайт, иммуноспецифичный ко второй молекуле, и один эпитопсвязывающий сайт иммуноспецифичный к третьей молекуле. В некоторых воплощениях вторая молекула представляет собой молекулу (например, CD2, CD3, CD8, CD16, T-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующую на поверхности эффекторной клетки, такой как T-лимфоцит, естественный киллер (NK) или другая мононуклеарная клетка. В некоторых воплощениях вторая молекула представляет собой CD3, а третья молекула представляет собой CD8.

D. Трехвалентные связывающие молекулы, содержащие домены Fc.

Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к трехвалентным связывающим молекулам, содержащим домен Fc, которые способны одновременно связывать первый эпитоп, второй эпитоп и третий эпитоп, причем по меньшей мере один из таких эпитопов не идентичен другому. Такие трехвалентные связывающие молекулы содержат три эпитопсвязывающих сайта, два из которых являются связывающими доменами по типу диатела, которые обеспечивают связывание сайта A и связывание сайта B, и один из которых является связывающим доменом Fab-типа или связывающим доменом scFv-типа, которые обеспечивают связывающий сайт C (см., например, фиг. 6A-6F и PCT № заявки: PCT/US15/33081 и PCT/US15/33076). Таким образом, такие трехвалентные связывающие молекулы включают домены "VL1"/"VH1", которые способны связываться с первым эпитопом и домены "VL2"/"VH2", которые способны связываться со вторым эпитопом и домены "VL3" и "VH3" которые способны связываться с "третьим" эпитопом такой трехвалентной связывающей молекулы. "Связывающий домен по типу диатела" является типом эпитопсвязывающего сайта, присутствующего в диателе, и, в частности, диателе DART®, как описано выше. Каждый из "связывающих доменов Fab-типа" и "связывающих доменов scFv-типа" являются эпитопсвязывающими сайтами, которые образованы взаимодействием домена VL легкой цепи иммуноглобулина и комплементарного домена VH тяжелой цепи иммуноглобулина. Связывающие домены Fab-типа отличаются от связывающих доменов по типу диатела, поскольку две полипептидные цепи, которые образуют связывающий домен Fab-типа, содержат только один эпитопсвязывающий сайт, тогда как две полипептидные цепи, которые образуют связывающий домен по типу диатела, включают не менее двух эпитопсвязывающих сайтов. Аналогичным образом, связывающие домены scFv-типа также отличаются от связывающих доменов по типу диатела, поскольку они содержат только один эпитопсвязывающий сайт. Таким образом, используемые в данном документе связывающие доме-

ны Fab-типа и scFv-типа отличаются от связывающих доменов по типу диатела.

Как правило, трехвалентные связывающие молекулы по настоящему изобретению будут содержать четыре различные полипептидные цепи (см. фиг. 6A, 6B), однако молекулы могут содержать меньшее или большее количество полипептидных цепей, например, путем слияния таких полипептидных цепей друг с другом (например, через пептидную связь) или путем деления таких полипептидных цепей с образованием дополнительных полипептидных цепей или путем связывания меньших или дополнительных полипептидных цепей через дисульфидные связи. Фиг. 6C-6F иллюстрируют этот аспект настоящего изобретения, схематически изображая такие молекулы, имеющие три полипептидные цепи. Как показано на фиг. 6A-6F, трехвалентные связывающие молекулы по настоящему изобретению могут иметь альтернативные ориентации, в которых области связывания типа диатела являются N-концевыми (фиг. 6A, 6C и 6D) или C-концевыми (фиг. 6B, 6E и 6F) относительно домена Fc.

В некоторых воплощениях первая полипептидная цепь таких трехвалентных связывающих молекул по настоящему изобретению включает: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, (iii) домен, способствующий гетеродимеризации, и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Домены VL1 и VL2 расположены на N-конце или C-конце относительно домена, содержащего CH2-CH3, как представлено в табл. 3 (см. также фиг. 6A и 6B). Вторая полипептидная цепь таких воплощений включает: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, способствующий гетеродимеризации. Третья полипептидная цепь таких воплощений содержит: (i) домен, содержащий VH3, (ii) домен, содержащий CH1, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Третья полипептидная цепь может быть тяжелой цепью антитела, которая включает VH3 и константную область тяжелой цепи, или полипептид, который содержит такие домены. Четвертый полипептид таких воплощений содержит: (i) домен, содержащий VL3, и (ii) домен, содержащий CL. Четвертые полипептидные цепи могут быть легкой цепью антитела, которая содержит VL3, комплементарный VH3 третьей полипептидной цепи, или полипептид, который содержит такие домены. Третья или четвертая полипептидные цепи могут быть выделены из встречающихся в природе антител. В ином случае, они могут быть сконструированы рекомбинантно, синтетически или другими способами.

Вариабельный домен легкой цепи первой и второй полипептидных цепей отделяются от переменных доменов тяжелой цепи таких полипептидных цепей промежуточным спейсерным пептидом, длина которого слишком коротка для того, чтобы позволить их доменам VL1/VH2 (или их VL2/VH1) ассоциироваться вместе для того, чтобы образовать эпитопсвязывающий сайт, способный связываться с первым или вторым эпитопом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) для этой цели имеет последовательность (SEQ ID NO:32): GGGSGGGG. Другие домены трехвалентных связывающих молекул могут быть разделены одним или несколькими промежуточными спейсерными пептидами (линкерами), необязательно содержащими остаток цистеина. В частности, как указано выше, такие линкеры обычно будут включены между переменными доменами (т.е. VH или VL) и пептидными доменами, способствующими гетеродимеризации, (например, E-спиральным или K-спиральным) и между пептидными доменами, способствующими гетеродимеризации, (например, E-спиральным или K-спиральным) и CH2-CH3-доменами. Примерные линкеры, полезные для получения трехвалентных связывающих молекул, приведены выше и также представлены в заявках PCT No: PCT/US15/33081 и PCT/US15/33076. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи таких трехвалентных связывающих молекул связываются вместе, образуя сайт связывания VL1/VH1, способный связывать первый эпитоп, а также сайт связывания VL2/VH2, который способен связывать второй эпитоп. Третья и четвертая полипептидные цепи таких трехвалентных связывающих молекул связываются вместе, образуя сайт связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом.

Как описано выше, трехвалентные связывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать три полипептида. Трехвалентные связывающие молекулы, содержащие три полипептидные цепи, могут быть получены путем связывания доменов N-конца четвертого полипептида с VH3-содержащим доменом третьего полипептида (например, с применением промежуточного спейсерного пептида (Линкер 4)). В ином случае, в третьей полипептидной цепи трехвалентной связывающей молекулы по изобретению, содержащей следующие домены, используется: (i) домен, содержащий VL3, (ii) домен, содержащий VH3, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, в которой VL3 и VH3 отделены друг от друга промежуточным спейсерным пептидом, который является достаточно длинным (по меньшей мере 9 или более аминокислотных остатков), для того, чтобы при ассоциации этих доменов мог образовываться эпитопсвязывающий сайт. Один предпочтительный промежуточный спейсерный пептид для этой цели имеет последовательность: GGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO:59).

Понятно, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 таких трехвалентных связывающих молекул могут быть разными, чтобы можно было обеспечить моноспецифическое, биспецифическое или триспецифическое связывание. В частности, домены VL и VH могут быть выбраны таким образом, чтобы трехвалентная связывающая молекула содержала два сайта связывания для первого эпитопа и один сайт связывания для второго эпитопа или один сайт связывания для первого эпитопа и два сайта связывания для второго эпитопа, или один сайт связывания для первого эпитопа, один сайт связывания для второго эпитопа и один сайт связывания для третьего эпитопа.

Однако, как указано в данном документе, эти домены предпочтительно выбирают таким образом, чтобы связывать эпитоп В7-Н3, эпитоп второй молекулы и эпитоп третьей молекулы. В некоторых воплощениях вторая молекула представляет собой молекулу (например, CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующую на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, клетка естественный киллер (NK) или другая мононуклеарная клетка. В некоторых воплощениях третья молекула представляет собой CD8.

Общая структура полипептидных цепей репрезентативных трехвалентных связывающих молекул по изобретению представлена на фиг. 6А-6F и в табл. 4.

Таблица 4

Четыре цепи 1-я ориентация	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL3-CL-COOH
Четыре цепи 2-я ориентация	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL3-CL-COOH
Три цепи 1-я ориентация	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
Три цепи 2-я ориентация	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD = домен, способствующий гетеродимеризации.

Одно воплощение настоящего изобретения относится к трехвалентным связывающим молекулам, которые включают два эпитопсвязывающих сайта для В7-Н3 и один эпитопсвязывающий сайт для второй молекулы. Два эпитопсвязывающих сайта для В7-Н3 могут связывать один и тот же эпитоп или различные эпитопы. Другое воплощение настоящего изобретения относится к трехвалентным связывающим молекулам, которые включают один эпитопсвязывающий сайт для В7-Н3 и два эпитопсвязывающих сайта для второй молекулы. Два эпитопсвязывающих участка для второй молекулы могут связывать один и тот же эпитоп или различные эпитопы второй молекулы. Еще одно воплощение настоящего изобретения относится к триспецифическим трехвалентным связывающим молекулам, которые включают один эпитопсвязывающий сайт для В7-Н3, один эпитопсвязывающий сайт для второй молекулы и один эпитопсвязывающий сайт для третьей молекулы. В некоторых воплощениях вторая молекула представляет собой молекулу (например, CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.), присутствующую на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, клетка естественный киллер (NK) или другая мононуклеарная клетка. В некоторых воплощениях вторая молекула представляет собой CD3, а третья молекула представляет собой CD8. Как указано выше, такие трехвалентные связывающие молекулы могут содержать три, четыре, пять или более полипептидных цепей.

VII. Модификация домена Fc.

Домен Fc из Fc-домен-содержащих молекул (например, антител, диател, трехвалентных связывающих молекул и т.д.) по настоящему изобретению может быть либо полным доменом Fc (например, полным доменом IgG Fc), либо только фрагментом домена Fc. Необязательно, домен Fc из Fc-домен-содержащих молекул по настоящему изобретению не имеет С-концевого аминокислотного остатка лизина.

В традиционной иммунной функции взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит к широкому спектру ответов, начиная от эффекторных функций, таких как антителозависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как регулирование пролиферации лимфоцитов и секреция антител. Все эти взаимодействия инициируются посредством связывания домена Fc антител или иммунных комплексов с специализированными клеточными рецепторами клеток на гематопозитических клетках. Разнообразие клеточных ответов, вызванных антителами и иммунными комплексами, обусловлено структурной гетерогенностью трех Fc-рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и FcγRIII (CD16) являются активирующими (т.е. усиливающими иммунную систему) рецепторами; FcγRIIB (CD32B) является ингибирующим (т.е. ослабляющим иммунную систему) рецептором. Кроме того, взаимодействие с неонатальным рецептором Fc (FcRn) опосредует рециркуляцию молекул IgG из эндосомы на поверхность клетки и высвобождение в кровь. Ниже представлена аминокислотная последовательность типичного IgG1 (SEQ ID NO:12), IgG2 (SEQ ID NO:13), IgG3 (SEQ ID NO:14) и IgG4 (SEQ ID NO:15) дикого типа.

Модификация домена Fc может привести к измененному фенотипу, например, измененному периоду полувыведения в сыворотке, измененной стабильности, измененной восприимчивости к клеточным

ферментам или измененной эффекторной функции. Поэтому может быть желательным модифицировать, например, Fc-домен-содержащую В7-НЗ-связывающую молекулу в отношении эффекторной функции для того, чтобы повысить эффективность такой молекулы при лечении рака. Снижение или исключение эффекторной функции желательны в некоторых случаях, например, в случае антител, механизм действия которых связан с блокированием или антагонизмом, но не с уничтожением клеток, несущих целевой антиген. Повышенная эффекторная функция, как правило, является желательной, когда она направлена на нежелательные клетки, такие как опухолевые и инородные клетки, где FcγR экспрессируются на низких уровнях, например, опухолеспецифические В-клетки с низким уровнем FcγRIIB (например, неходжкинская лимфома, CLL, и лимфома Беркитта). Молекулы по изобретению, обладающие такой назначенной или измененной эффекторной функциональной активностью, полезны для лечения и/или профилактики заболевания, расстройства или инфекции, в которых желательна повышенная эффективность активности эффекторных функций.

Соответственно, в некоторых воплощениях домен Fc из Fc-домен-содержащих молекул настоящего изобретения может быть сконструированным вариантным доменом Fc. Хотя домен Fc из биспецифических Fc-домен-содержащих молекул по настоящему изобретению может обладать способностью связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами (например, FcγR (R)), более предпочтительно, если такой вариантный домен Fc имеет измененное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого доменом Fc дикого типа), например, будет иметь усиленное связывание с активирующим рецептором и/или будет иметь существенно сниженное связывание или не будет обладать способностью связываться с ингибирующим рецептором(ами). Таким образом, домен Fc из Fc-домен-содержащих молекул по настоящему изобретению может включать часть или весь домен CH2 и/или часть или весь домен CH3 полного домена Fc или может включать вариант CH2 и/или вариант CH3 (который может включать, например, одну или несколько вставок и/или одну или несколько делеций по отношению к доменам CH2 или CH3 полного домена Fc). Такие домены Fc могут содержать фрагменты не-Fc-полипептида, или могут содержать части неприродных полных доменов Fc или могут содержать неприродные ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2 или два CH3 или в направлении от N- к C-концу, домен CH3, связанный с доменом CH2 и т.д.).

Модификации домена Fc, идентифицированные как изменяющие эффекторную функцию, известны в данной области, и включают модификации, которые увеличивают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и уменьшают связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B) (см., например, Stavenhagen, JB et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors", Cancer Res. 57(18):8882-8890). В табл. 5 приведены типичные одиночные, двойные, тройные, четверные и пятикратные замены (нумерация и замены относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12) типичной модификации, которая увеличивает связывание с активирующими рецепторами и/или уменьшает связывание с ингибирующими рецепторами.

Таблица 5

Вариации предпочтительных активирующих доменов Fc

Вариации в одном сайте			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Вариации в двух сайтах			
F243L и R292P	F243L и Y300L	F243L и P396L	R292P и Y300L
D270E и P396L	R292P и V305I	P396L и Q419H	P247L и N421K
R292P и P396L	Y300L и P396L	R255L и P396L	R292P и P305I
K392T и P396L			
Вариации в трех сайтах			
F243L, P247L и N421K		P247L, D270E и N421K	
F243L, R292P и Y300L		R255L, D270E и P396L	
F243L, R292P и V305I		D270E, G316D и R416G	
F243L, R292P и P396L		D270E, K392T и P396L	
F243L, Y300L и P396L		D270E, P396L и Q419H	
V284M, R292L и K370N		R292P, Y300L и P396L	
Вариации в четырех сайтах			
L234F, F243L, R292P и Y300L		F243L, P247L, D270E и N421K	
L234F, F243L, R292P и Y300L		F243L, R255L, D270E и P396L	
L235I, F243L, R292P и Y300L		F243L, D270E, G316D и R416G	
L235Q, F243L, R292P и Y300L		F243L, D270E, K392T и P396L	
P247L, D270E, Y300L и N421K		F243L, R292P, Y300L и P396L	
R255L, D270E, R292G и P396L		F243L, R292P, V305I и P396L	
R255L, D270E, Y300L и P396L		F243L, D270E, P396L и Q419H	
D270E, G316D, P396L и R416G			
Вариации в пяти сайтах			
L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L		F243L, R292P, V305I, Y300L и P396L	
L235P, F243L, R292P, Y300L и P396L			

Примерные варианты доменов Fc из IgG1 человека с уменьшенным связыванием с CD32B и/или повышенным связыванием с CD16A содержат замены F243L, R292P, Y300L, V305I или P296L. Эти аминокислотные замены могут присутствовать в домене Fc из IgG1 человека в любой комбинации. В одном воплощении вариантный домен Fc из IgG1 человека содержит замены F243L, R292P и Y300L. В другом

воплощении вариантный домен Fc из IgG1 человека содержит замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L.

В некоторых воплощениях предпочтительно, чтобы домены Fc из В7-Н3-связывающих молекул по настоящему изобретению демонстрировали уменьшенное (или практически отсутствующее) связывание с FcγRIА (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a)) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого доменом Fc из IgG1 дикого типа (SEQ ID NO:12)). В конкретном воплощении В7-Н3-связывающие молекулы настоящего изобретения содержат домен Fc из IgG, который демонстрирует уменьшенную эффекторную функцию ADCC. В предпочтительном воплощении домены CH2-CH3 таких В7-Н3-связывающих молекул включают любые 1, 2, 3 или 4 замены: L234A, L235A, D265A, N297Q и N297G. В другом воплощении домены CH2-CH3 включают замену N297Q, замену N297G, замены L234A и L235A или замену D265A, поскольку эти мутации устраняют связывание с FcR. В ином случае, используется домен CH2-CH3 естественного домена Fc, который по своей природе проявляет уменьшенное (или практически отсутствующее) связывание с FcγRIIA (CD16a) и/или сниженную эффекторную функцию (относительно связывания и эффекторной функции, проявляемой доменом Fc из IgG1 дикого типа (SEQ ID NO:12)). В конкретном воплощении В7-Н3-связывающие молекулы настоящего изобретения содержат домен Fc из IgG2 (SEQ ID NO:13) или домен Fc из IgG4 (SEQ ID NO:4). Когда используется домен Fc из IgG4, настоящее изобретение также охватывает введение стабилизирующей мутации, такой как замена S228P в шарнирном домене, описанная выше (см., например, SEQ ID NO:11). Поскольку замены N297G, N297Q, L234A, L235A и D265A отменяют эффекторную функцию, в тех случаях, когда желательна эффекторная функция, эти замены предпочтительно не будут использоваться.

Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 из Fc-домен-содержащих молекул по настоящему изобретению, имеющих пониженную или отсутствующую эффекторную функцию, будет включать замены L234A/L235A (SEQ ID NO:60)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYVY LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHF
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Период полувыведения белков в сыворотке, содержащих домены Fc, может быть увеличен за счет увеличения аффинности связывания домена Fc с FcRn. Используемый в данном документе термин "период полувыведения" означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое является мерой среднего времени выживания молекул после их введения. Период полувыведения может быть выражен как время, необходимое для устранения 50% известного количества молекулы из организма объекта (например, человека или другого млекопитающего) или, например, из его определенного отдела, измеренный в сыворотке, т.е. период полувыведения в кровотоке или в других тканях. В общем, увеличение периода полувыведения приводит к увеличению среднего времени удержания (MRT) в кровотоке для введенной молекулы.

В некоторых воплощениях В7-Н3-связывающие молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный домен Fc, где указанный вариантный домен Fc включает по меньшей мере одну модификацию аминокислоты относительно домена Fc дикого типа, так что указанная молекула имеет увеличенный период полувыведения (относительно молекулы, содержащей домен Fc дикого типа). В некоторых воплощениях В7-Н3-связывающей молекулы по настоящему изобретению содержат вариантный домен Fc из IgG, где указанный домен Fc домена включает аминокислотную замену для увеличения периода полувыведения в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 и 436. Многочисленные мутации, способные увеличивать период полувыведения Fc-домен-содержащей молекулы, известны в данной области и включают, например, M252Y, S254T, T256E и их комбинации. Например, см. мутации, описанные в пат. США №№ 6277375, 7083784; 7217797, 8088376; публ. США №№ 2002/0147311; 2007/0148164 и публ. PCT №№ WO 98/23289; WO 2009/058492; и WO 2010/033279, которые включены в настоящее описание ссылкой во всей полноте. В7-Н3-связывающие молекулы с увеличенным периодом полувыведения также включают те, которые обладают вариантными доменами Fc, которые включают замены в двух или более остатках домена Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 и 436. В частности, две или более замен, выбранных из T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K и Y436I.

В конкретном воплощении В7-Н3-связывающая молекула по настоящему изобретению, имеет вариантный домен Fc из IgG, включающий замены:

- (A) M252Y, S254T и T256E;
- (B) M252Y и S254T;
- (C) M252Y и T256E;
- (D) T250Q и M428L;

- (E) T307Q и N434A;
- (F) A378V и N434A;
- (G) N434A и Y436I;
- (H) V308P и N34A или
- (I) K288D и H435K.

В предпочтительном воплощении В7-Н3-связывающая молекула по настоящему изобретению имеет вариантный домен Fc из IgG, включающие любые 1, 2 или 3 замены: M252Y, S254T и T256E. Изобретение далее охватывает В7-Н3-связывающие молекулы, обладающие вариантными доменами Fc, включающие:

- (A) одну или несколько мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или FcγR; и
- (B) одну или несколько мутаций, которые продлевают период полувыведения в сыворотке.

Для некоторых антител, диател и трехвалентных связывающих молекул, чьи Fc-домен-содержащие первая и третья полипептидные цепи не являются идентичными, желательнее уменьшить или предотвратить гомодимеризацию между доменами CH2-CH3 двух первых полипептидных цепей или между доменами CH2-CH3 двух третьих полипептидных цепей. Домены CH2 и/или CH3 таких полипептидных цепей не обязательно должны быть одинаковыми по последовательности и преимущественно модифицированы для содействия образованию комплекса между двумя полипептидными цепями. Например, замещение аминокислоты (предпочтительно замещение аминокислотой, содержащей громоздкую боковую группу, образующую "выступ", например, триптофаном), может быть введена в домен CH2 или CH3, так что стерическая интерференция предотвратит взаимодействие с аналогично мутированным доменом и обязывает мутированный домен спариваться с доменом, в котором была спроектирована комплементарная или вмещающая мутация, т.е. "отверстие" (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций могут быть сконструированы в любой паре полипептидов, содержащих домены CH2-CH3, которые образуют домен Fc, способствующий гетеродимеризации. Способы белковой инженерии, способствующие гетеродимеризации, а не гомодимеризации, хорошо известны в данной области, в частности, в отношении инженерии иммуноглобулиноподобных молекул и охватываются данным документом (см., например, Ridgway et al. (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35 и Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; каждый из которых полностью включен в настоящее описание ссылкой).

Предпочтительный выступ создается путем изменения домена Fc из IgG так, чтобы он содержал модификацию T366W. Предпочтительное углубление создается путем модификации домена Fc из IgG так, чтобы он содержал модификации T366S, L368A и Y407V. Чтобы облегчить очистку гомодимера третьей полипептидной цепи, несущей углубление, от конечной биспецифической Fc-домен-содержащей гетеродимерной молекулы, сайт связывания протеина А в доменах CH2 и CH3, несущих углубление, третьей полипептидной цепи предпочтительно мутирован путем аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи, несущий углубление, не будет связываться с протеином А, тогда как биспецифический гетеродимер сохранит свою способность связывать протеин А через сайт связывания протеина А в первой полипептидной цепи. В альтернативном воплощении третья полипептидная цепь, несущая углубление, может включать аминокислотные замены в положениях 434 и 435 (N434A/N435K).

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG для доменов CH2 и CH3 первой полипептидной цепи Fc-домен-содержащей молекулы, по настоящему изобретению, будет иметь "несущую выступ" последовательность (SEQ ID NO:61)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG для доменов CH2 и CH3 второй полипептидной цепи Fc домен-содержащей молекулы по настоящему изобретению, имеющей две полипептидные цепи (или третья полипептидная цепь Fc-домен-содержащей молекулы, имеющей три, четыре, или пять полипептидных цепей) будет иметь "несущую углубление" последовательность (SEQ ID NO:62)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Следует отметить, что домены CH2-CH3 из SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:62 включают замену в положении 234 на аланин и 235 на аланин и, таким образом, образуют домен Fc, демонстрирующий сниженное (или практически отсутствующее) связывание с FcγRIА (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, демонстрируемого доменом Fc дикого типа (SEQ ID NO:12)). Изобретение также охватывает такие домены CH2-CH3, которые включают остатки аланина дикого типа, альтернативные и/или дополнительные замены, которые модифицируют эффекторную функцию и/или активность связывания с FcR домена Fc. Изобретение также охватывает такие домены CH2-CH3, которые дополнительно включают одну или несколько аминокислотных замен, увеличивающих период полувыведения. В частности, изобретение охватывает такие несущие углубления и такие несущие выступ домены CH2-CH3, которые дополнительно включают M252Y/S254T/T256E.

Предпочтительно, если первая полипептидная цепь будет иметь "несущую выступ" последовательность CH2-CH3, такую как последовательность SEQ ID NO:61. Однако, как будет признано, в первой полипептидной цепи может быть использован "несущий углубление" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO:62), и в этом случае "несущий выступ" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO:61) будет использоваться во второй полипептидной цепи Fc-домен-содержащей молекулы по настоящему изобретению, имеющей две полипептидные цепи (или в третьей полипептидной цепи Fc-домен-содержащей молекулы, имеющей три, четыре или пять полипептидных цепей).

В других воплощениях изобретение охватывает B7-H3-связывающие молекулы, содержащие домены CH2 и/или CH3, которые были спроектированы для содействия гетеродимеризации, а не гомодимеризации, с применением мутаций, известных в данной области, таких как раскрытые в публ. РСТ №№ WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, все из которых включены в настоящее описание ссылкой во всей полноте.

VIII. Способности к связыванию с эффекторными клетками.

В соответствии с данным документом B7-H3-связывающие молекулы по изобретению, включая молекулы B7-H3-ADC, могут быть сконструированы так, чтобы они содержали комбинацию эпитопсвязывающих сайтов, которые распознают множество антигенов, уникальных для клетки-мишени или типа ткани. В частности, настоящее изобретение относится к мультиспецифическим B7-H3-связывающим молекулам, которые способны связываться с эпитопом B7-H3 и эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки, такой как Т-лимфоцит, естественный киллер (NK) или другая мононуклеарная клетка. Например, B7-H3-связывающие молекулы по настоящему изобретению может быть конструкцией, содержащей эпитопсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает CD2, CD3, CD8, CD16, Т-клеточный рецептор (TCR) или NKG2D. Изобретение также относится к триспецифическим B7-H3-связывающим молекулам, которые способны связываться с эпитопом CD3 и эпитопом CD8 (см., например, публ. РСТ № WO 2015/026894).

A. Способности к связыванию с CD2.

В одном воплощении биспецифические, триспецифические или мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы по изобретению способны связываться с эпитопом B7-H3 и эпитопом CD2. CD2 представляет собой молекулу клеточной адгезии, обнаруженную на поверхности Т-клеток и клеточестественных киллеров (NK). CD2 усиливает цитотоксичность NK-клеток, возможно, в качестве промотора образования нанотрубок NK-клетками (Mace, E.M. et al. (2014) "Cell Biological Steps and Checkpoints in Accessing NK Cell Cytotoxicity", Immunol. Cell. Biol. 92(3):245-255; Comerchi, C.J. et al. (2012) "CD2 Promotes Human Natural Killer Cell Membrane Nanotube Formation", PLoS One 7(10):e47664:1-12). Молекулы, которые специфически связывают CD2 включают анти-CD2 антитело "Lo-CD2a".

Аминокислотная последовательность домена VH из Lo-CD2a (учетный номер ATCC No: 11423); SEQ ID NO:63) показана ниже (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

EVQLQQSGPE LQRPGASVKL SCKASGYIFT EYYMYWVKQR PKQGLELVGR
IDPEDGSIDY VEKFKKKATL TADTSSNTAY MQLSLSLTS ED TATYFCARGK
FNRYRFAYWGQ GTLVTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из Lo-CD2a (учетный номер ATCC № 11423, SEQ ID NO:64) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DVVLTTQTPPT LLATIGQSVS ISCRSSQSL HSSGNTYLNW LLQRTGQSPQ
PLIYLVSQLE SGVPNRFGS GSGTDFTLKI SGVEAEDLGV YYCMQFTHY
YTFGAGTKLE LK

B. Способности к связыванию CD3.

В одном воплощении биспецифические, триспецифические или мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы по изобретению способны связываться с эпитопом B7-H3 и эпитопом CD3. CD3 представляет собой ко-рецептор Т-клеток, состоящий из четырех различных цепей (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling", Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; с. 1-14). У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3γ, цепь CD3δ и две цепи CD3ε. Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), для того, чтобы генерировать сигнал активации в Т-лимфоцитах. В

отсутствие CD3 TCR не собираются должным образом и деградируют (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer", Immunology 129(2): 170-177). CD3 обнаруживается связанным с мембранами всех зрелых Т-клеток и практически не обнаруживается на других типах клетках (см., Janeway, C.A. et al. (2005) In: Immunobiology: The Immune System In Health And Disease", 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214-216; Sun, Z.J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ Heterodimer", Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex", Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139). Молекулы, которые специфически связывают CD3, включают анти-CD3-антитела "CD3 mAb-1" и "ОКТ3". Анти-CD3-антитело CD3 mAb-1 способно связывать белок приматов, не являющихся человеком (например, яванского макака).

Аминокислотная последовательность домена VH из CD3 mAb-1 VH (1) (SEQ ID NO:65) показана ниже (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
 HGNEFGNSYVS WFAIWGQGTI VTVSS

Аминокислотная последовательность альтернативного домена VH из CD3 mAb-1 VH (2) (SEQ ID NO:66) показана ниже (остатки CDR_H показаны одним подчеркиванием; различия относительно домена VH из CD3 mAb-1 VH (1) (SEQ ID NO:65) показаны двойным подчеркиванием).

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
 HGNEFGNSYVS WFAIWGQGTI VTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Область VH из CD3 mAb-1 VH (1) (SEQ ID NO:65) можно использовать с доменом VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) с образованием функциональной CD3-связывающей молекулы в соответствии с настоящим изобретением. Аналогично, домен VH из CD3 mAb-1 VH (2) (SEQ ID NO:66) можно использовать с доменом VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) с образованием функциональной CD3-связывающей молекулы в соответствии с настоящим изобретением.

Как обсуждается ниже, для лучшей иллюстрации настоящего изобретения были получены биспецифические B7-H3 x CD3-связывающие молекулы. В некоторых конструкциях B7-H3 x CD3 использовался вариант CD3 mAb-1. Вариант "CD3 mAb-1 (D65G)" содержит домен VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) и домен VH из CD3 mAb-1, имеющий замену D65G (положение 65 по Kabat, соответствующее остатку 68 из SEQ ID NO:65). Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из CD3 mAb-1 (D65G) (SEQ ID NO:68) (показаны остатки CDR_H, замещенное положение (D65G) показано двойным подчеркиванием)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA
 PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT
 EDTAVYYCVR HGNEFGNSYVS WFAIWGQGTI VTVSS

В ином случае, может быть включен аффинный вариант CD3 mAb-1.

Варианты включают вариант с низкой аффинностью, обозначенный как "CD3 mAb-1 Low", и вариант с более быстрой скоростью диссоциации, обозначенный как "CD3 mAb-1 Fast". Домен VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) является общим для CD3 mAb-1 Low и CD3 mAb-1 Fast и представлен выше. Ниже приведены аминокислотные последовательности доменов VH каждого из CD3 mAb-1 Low и CD3 mAb-1 Fast.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из анти-CD3 человека mAb-1 Low (SEQ ID NO:69) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием, различия относительно домена VH CD3 mAb-1 VH (1) (SEQ ID NO:65) показаны двойным подчеркиванием)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA
 PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT
 EDTAVYYCVR HGNEFGNSYVT WFAIWGQGTI VTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность цепи домена VH из анти-CD3 человека mAb-1 Fast (SEQ ID NO:70) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием, различия относительно домена VH CD3 mAb-1 VH (1) (SEQ ID NO:65) показаны двойным подчеркиванием)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA
 PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT
 EDTAVYYCVR HKNEFGNSYVT WFAIWGQGTI VTVSS

Другим анти-CD3-антителом, которое может быть использовано, является антитело Muromonab-CD3 "ОКТ3" (Xu et al. (2000) "In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies", Cell. Immunol. 200:16-26); Norman, D.J. (1995) "Mechanisms Of Action And Overview Of OKT3", Ther. Drug Monit. 17(6):615-620; Canafax, D.M. et al. (1987) "Monoclonal Antilymphocyte Antibody

(ОКТ3) Treatment Of Acute Renal Allograft Rejection" Pharmacotherapy 7(4): 121-124; Swinnen, L.J. et al. (1993) "ОКТ3 Monoclonal Antibodies Induce Interleukin-6 And Interleukin-10: A Possible Cause Of Lymphoproliferative Disorders Associated With Transplantation", Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2(4):670-678).

Аминокислотную последовательность из домена VH из ОКТ3 (SEQ ID NO:71) показана ниже (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR
 PGQGLEWIGY INPSRGYTN NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED
 SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из ОКТ3 (SEQ ID NO:72) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

QIVLTQSPAI MSASPGKEVT MTCASSSVS YMNWYQKSG TSPKRWIYDT
 SKLASGVPAN FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQW SSNPFTFGSG TKLEINR

Дополнительные анти-CD3 антитела, которые могут быть использованы, включают, без ограничения указанным, те, которые описаны в публикациях PCT №№ WO 2008/119566 и WO 2005/118635.

C. Способности к связыванию CD8.

В одном воплощении биспецифические, триспецифические или мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы по изобретению способны связываться с эпитопом B7-H3 и эпитопом CD8. CD8 представляет собой ко-рецептор T-клеток, состоящий из двух различных цепей (Leahy, D.J., (1995) "A Structural View of CD4 and CD8", FASEB J., 9:17-25), который экспрессируется на цитотоксических T-клетках. Обнаружено, что активация CD8⁺ T-клеток опосредована путем костимулирующих взаимодействий между молекулярным комплексом антиген: основной комплекс гистосовместимости I класса (MHC I), который размещается на поверхности клетки-мишени и комплекса CD8 и T-клеточного рецептора, которые размещены на поверхности CD8⁺ T-клетки (Gao, G., and Jakobsen, B., (2000). "Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-Cell Receptor". Immunol Today 21: 630-636). В отличие от молекул MHC II, которые экспрессируются только определенными клетками иммунной системы, молекулы MHC I экспрессируются очень широко. Таким образом, цитотоксические T-клетки способны связываться с широким диапазоном типов клеток. Активированные цитотоксические T-клетки опосредуют гибель клеток путем высвобождения цитотоксинов, перфорина, гранзимов и гранулизинов. Антитела, которые специфически связывают CD8, включают анти-CD8 антитела "ОКТ8" и "TRX2".

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из ОКТ8 (SEQ ID NO:73) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKASGYTFT DYNMHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYTGTY NQKFKNKATL TVDSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARNF
 RYTYWYFDVW GQGTIVTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL ОКТ8 (SEQ ID NO:74) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYDNSLMHWY QQKPGQPPKV
 LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFLTID PVEADDAATY YCQQNEDPY
 TFGGGTKLEI KR

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH TRX2 (SEQ ID NO:75) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLVESGGG VVQPRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRA PGKGLEWVAL
IYDGSNKEY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
YDGYHHFFDS WGQGLVTVS S

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL TRX2 (SEQ ID NO:76) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQKP GKAPKLLIYN
TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCYQ YNGYTFGQG TKVEIK

D. Способности к связыванию CD16.

В одном воплощении мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы по изобретению способны связываться с эпитопом B7-H3 и эпитопом CD16. CD16 является рецептором FcγRIIIA. CD16 экспрессируют нейтрофилы, эозинофилы, клетки-естественные киллеры (NK) и тканевые макрофаги, которые связывают агрегированный, но не мономерный IgG человека (Peltz, G.A. et al. (1989) "Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, And Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3): 1013-1017; Bachanova, V. et al. (2014) "NK Cells In Therapy Of Cancer", Crit. Rev. Oncog. 19 (1-2): 133-141; Miller, J.S. (2013) "Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic", Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2013: 247-253; Youinou, P. et al. (2002) "Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases", Autoimmun Rev. 1(1-2): 13-19; Peipp, M. et al. (2002) "Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells", Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511). Молекулы, которые специфически связывают CD16, включают антитела против CD16 "3G8" и "A9". Гуманизированные антитела A9 описаны в публ. PCT WO 03/101485.

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из 3G8 (SEQ ID NO:77) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVTLKESGPG ILQPSQTL^SL TCSFSGFSLR TSGMGVGVWIR QPSGKGLEWL
 AHIWWD^DDKR YNPALKSRLT ISKDTSSNQV FLKIASVDTA DTATYYCAQI
 NPAWFAYW^GQ GTLVTVSA

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из 3G8 (SEQ ID NO:78) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSV^D FDGDFEMNWY QQKPGQPPKL
 LIY^TTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQ^SSNEDPY TFGGGTKLEI
 K

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из A9 (SEQ ID NO:79) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLQQSGAE LVRPGTSVKI SCKASGYTFT NYWLGWVKQR PGHGLEWIGD
 IYPGGGY^TNY NEKFKGKATV TADTSSRTAY VQVRS^LTSED SAVYFCARSA
 SWYFDVWGAR TTVT^VSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из A9 (SEQ ID NO:80) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

DIQAVVTQES ALTTSPGETV TLTCRSNT^GI VTTSNYANWV QEKPDHLFTG
 LIGHT^NNRAP GVPARFSGSL IGDKAALTIT GAQTEDEAIY FCALWYNN^HW
 YFGGGTKLTV L

Дополнительные анти-CD19-антитела, которые могут быть использованы, включают, без ограничения указанным, те, которые описаны в публикациях PCT WO 03/101485; и WO 2006/125668.

Е. Способности к связыванию TCR.

В одном воплощении биспецифические, триспецифические или мультиспецифические В7-Н3-связывающие молекулы по изобретению способны связываться с эпитопом В7-Н3 и эпитопом Т-клеточного рецептора (TCR). Т-клеточный рецептор изначально экспрессируется CD4+ или CD8+ Т-клетками и позволяет таким клеткам распознавать антигенные пептиды, которые связаны и представлены белками МНС класса I или класса II антигенпрезентирующих клеток. Распознавание комплекса рМНС (пептид-МНС) с помощью TCR инициирует распространение клеточного иммунного ответа, что приводит к образованию цитокинов и лизису антигенпредставляющей клетки (см., например, Armstrong, KM et al. (2008) "Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes", Biochem. J. 415(Pt 2): 183-196; Willemsen, R. (2008) "Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy", Cytometry A. 73(11): 1093-1099; Beier, K.C. et al. (2007) "Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation", Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. et al. (2005) "Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes", Am. J. Ther. 12(6):534-550). CD3 представляет собой рецептор, который связывается с TCR (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer", Immunology 129(2): 170-177; Guy, C.S. et al. (2009) "Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex", Immunol. Rev. 232(1):7-21; St. Clair, E.W. (Epub 2009 Oct 12) "Novel Targeted Therapies For Autoimmunity", Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657; Baeuerle, P.A. et al. (Epub 2009 Jun 9) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944; Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) "T Cell Activation", Annu. Rev. Immunol. 27:591-619; Renders, L. et al. (2003) "Engineered CD3 Antibodies For Immunosuppression", Clin. Exp. Immunol. 133(3):307-309).

Молекулы, которые специфически связываются с Т-клеточным рецептором, включают антитело против TCR "BMA 031" (EP 0403156, Kurrle, R. et al. (1989) "BMA 031 - A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application", Transplant Proc. 21(1 Pt 1): 1017-1019; Nashan, B. et al. (1987) "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex", Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell", J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor", J. Immunol. 147(12):4366-4373).

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из BMA 031 (SEQ ID NO:81) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYKFT SYVMHWVRQA PGQGLEWIGY
 INPYNDVTKY NEKFKGRVTI TADKSTSTAY LQMNLSRSED TAVHYCARGS
 YYDYDGFVYW GQGTLVTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из BMA 031 (SEQ ID NO:82) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT
 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLOPE DFATYYCQ^W SSNPLTFGGQ TKLEIK

Ф. Способности к связыванию NKG2D.

В одном воплощении мультиспецифические В7-Н3-связывающие молекулы по изобретению способны связываться с эпитопом В7-Н3 и эпитопом рецептора NKG2D. Рецептор NKG2D экспрессируется на всех человеческих (и из других млекопитающих) клетках-естественных киллерах (Bauer, S. et al.

(1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA", Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing", Immunity 17(1): 19-29) as well as on all CD8⁺ T cells (Groh, V. et al. (2001) "Costimulation Of CD8 $\alpha\beta$ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells", Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing", Immunity 17(1): 19-29). Такие связывающие лиганды, и особенно те, которые не экспрессируются на нормальных клетках, включают молекулу гистосовместимости 60 (H60), продукт раннего гена индуцируемого ретиноевой кислотой-1 (RAE-1) и транскрипт 1, подобный мышинному UL16-связывающему белку (MULT1) (Raulet DH (2003) "Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands", Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al. (2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells" Blood 106:1711-1717). Молекулы, которые специфически связываются с рецептором NKG2D, включают антитела против NKG2D "КЫК-1.0" и "КЫК-2.0" (Kwong, KY et al. (2008) "Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity", J. Mol. Biol. 384:1143-1156; and PCT/US09/54911).

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из КЫК-1.0 (SEQ ID NO:83) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAF
IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTKY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR
FGYYLDYWGQ GTLVTVSS

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL из КЫК-1.0 (SEQ ID NO:84) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

QPVLTPQSSV SVAPGETARI PCGGDDIETK SVHWYQQKPG QAPVLVIIYDD
DDRPSGIPER FFGSNGSNTA TLSISRVEAG DEADYYCQVW DDNDEWVFG
GGTQLTVL

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VH из КЫК-2.0 (SEQ ID NO:85) (остатки CDR_H показаны подчеркиванием)

QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAF
IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR
GLGDGYFDY WGQGTVTVS S

Ниже показана аминокислотная последовательность домена VL КЫК-2.0 (SEQ ID NO:86) (остатки CDR_L показаны подчеркиванием)

QSALTQPAV SGSPGQSITI SCSGSSSNG NNAVNWYQQL PGKAPKLLIY
YDILLPSGVS DRFSGSKSGT SAFLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGPY
FGGGTKLTVL

IX. Мультиспецифические B7-H3-связывающие молекулы А.

B7-H3 x CD3 Биспецифические двухцепочечные диатела.

Области VL и VH вышеописанных связывающих молекул B7-H3 могут быть использованы для конструирования биспецифических диател B7-H3 x CD3, состоящих из двух ковалентно связанных полипептидных цепей. Чтобы проиллюстрировать этот аспект настоящего изобретения, домены VL и VH вышеописанного анти-B7-H3 антитела mAb-D использовали для конструирования биспецифических диател B7-H3 x CD3, состоящих из двух ковалентно связанных полипептидных цепей и содержащих обусждаемые выше мышинные или гуманизированные домены VL и VH из mAb-D. Ниже представлена общая структура и аминокислотные последовательности таких биспецифических диател B7-H3 x CD3.

Первая полипептидная цепь одного примерного биспецифического двухцепочечного диатела B7-H3 x CD3 содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL из анти-B7-H3 антитела (например, mAb-D VL (SEQ ID NO:22) или hmAb-D VL (SEQ ID NO:30); промежуточный спейсерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); домен VH из анти-CD3-антитела (например, CD3 mAb 1 (D65G) (SEQ ID NO:68)); цистеинсодержащий промежуточный спейсерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO:33)); домен, способствующий гетеродимеризации (например, E-спираль) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:45)); и С-конец.

Вторая полипептидная цепь такого примерного биспецифического двухцепочечного диатела B7-H3 x CD3 содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL соответствующего анти-CD3-антитела (например, VL-домен, который совместно с доменом VH первой полипептидной цепи образует сайт связывания CD3, например, домен VL из CD3-mAb-1 (SEQ ID NO:67), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)), домен VH соответствующий анти-B7-H3 антителу (например, домен VH, который в сочетании с доменом VL первого полипептида цепь образует сайт связывания B7-H3, например, VH из mAb-D (SEQ ID NO:26) или VH из hmAb-D (SEQ ID NO:31); цистеинсодержащий промежуточный спейсерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO:33)), домен, способствующий гетеродимеризации (например, K-спираль) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:46)) и С-конец.

В соответствии с данным документом, альтернативные линкеры и/или альтернативные домены, способствующие гетеродимеризации, могут быть использованы для получения таких диател. Например,

первая полипептидная цепь альтернативного примерного биспецифического двухцепочечного диатела В7-Н3 х CD3 может содержать в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL из анти-В7-Н3 антитела; промежуточный спейсерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); домен VH из анти-CD3-антитела или соответствующего анти-CD3 антитела; промежуточный спейсерный пептид (линкер 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)); цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации (например, К-спираль) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:46)); и С-конец. Вторая полипептидная цепь такого альтернативного примерного диатела может содержать в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL соответствующего анти-CD3-антитела; промежуточный спейсерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); домен VH соответствующего анти-В7-Н3 антитела (например, VH из mAb-D (SEQ ID NO:26) или hVH из mAb-D (SEQ ID NO:31)); промежуточный спейсерный пептид (линкер 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)); цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации (например, Е-спираль) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:47)); и С-конец.

1. DART-D1.

Сконструировано репрезентативное BIS-Н3 х CD3 биспецифическое двухцепочечное диатело, содержащее домены VH и VL из hmAb-C ("DART-D1").

Ниже показана аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи DART-D1 (SEQ ID NO:87) (подчеркнута последовательность домена VL из hmAb-C (SEQ ID NO:20))

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASESIY SYLAWYQQKP GKAPKLLVYN
 TKTLPEGVPS RFSGSGSGTD FLTLSLQP EDFATYYCQH HYGTPPWTFG
QGTRLEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GSLRLSCAA SGFTFSTYAM
 NWVRQAPGKG LEWVGRIRSK YNNYATYYAD SVKGRFTISR DDSKNSLYLQ
 MNSLKTEDTA VYVCVRHGNE GNSYVSWFAY WGQGLTVTVS SGGCGGGEVA
 ALEKEVAALE KEVAALEKEV AALEK

Ниже показана аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи DART-D1 (SEQ ID NO:88) (подчеркнута последовательность домена VH из hmAb-C (SEQ ID NO:21))

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFTFSSY
 GMSWVRQAPG KGLEWVATIN SGSNTIYYPD SLKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA VYVCARHDGG AMDYWQGGT VTVSSGGCGG GKVAALKEK
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

2. DART-D2.

Сконструировали репрезентативное BIS-Н3 х CD3 биспецифическое двухцепочечное диатело, содержащее домены VH и VL из hmAb-D ("DART-D2").

Ниже показана аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи DART-D2 (SEQ ID NO:89) (подчеркнута последовательность домена VL из hmAb-D (SEQ ID NO:30))

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASONVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
 ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FLTLSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YVCVRHGNE NSYVSWFAYW GQGLTVTVSS ASTKGEVAAC
 EKEVAALEKE VAALKEVAAL KEK

Ниже показана аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи DART-D2 (SEQ ID NO:90) (подчеркнута последовательность домена VH из hmAb-D (SEQ ID NO:31))

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSY
GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SSGTIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA VYVCARHGYR YEGFDYWGGQ TTVTSSAST KGKVAACEK
 VAALKEKVAAL KEKVAALKE

Следует принять во внимание в свете описания, изложенного в данном документе о том, что для получения альтернативных двухцепочечных диател В7-Н3 х CD3 можно использовать различные доменные ориентации, домены VH, домены VL, линкеры и/или домены, способствующие гетеродимеризации.

В. В7-Н3 х CD3 биспецифические трехцепочечные диатела.

Получали В7-Н3 х CD3-диатело, имеющее три цепи и обладающее доменом Fc, которое имеет один сайт связывания, специфичный к В7-Н3 (содержащий гуманизированные домены VH и VL из hmAb-D) и один сайт связывания, специфичный к CD3 (содержащий Домены VL и VH из CD3 mAb 1 (D65G)). Диатело обозначается как "DART-D3".

Первая полипептидная цепь примерного биспецифического трехцепочечного диатела DART-D3 В7-Н3 х CD3 содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL из анти-В7-Н3 антитела (VL из hmAb-D (SEQ ID NO:30), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)), домен VH из CD3 mAb 1 (DGCG) (SEQ ID NO:68), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)), цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации (Е-спираль) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:47)); промежуточный спейсерный

пептид (линкер 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:57)); Несущий выпуклость домен CH2-CH3 из IgG1 (SEQ ID NO:61); и С-конец. Полинуклеотиды, кодирующие этот полипептидную цепь могут кодировать С-концевой остаток лизина SEQ ID NO:61 (т.е. X из SEQ ID NO:61), однако, как указывалось выше, этот остаток лизина может быть посттрансляционно удален в некоторых системах экспрессии. Соответственно, настоящее изобретение включает такую первую полипептидную цепь, которая содержит такой остаток лизина (т.е. SEQ ID NO:61, где X представляет собой лизин), а также первую полипептидную цепь, которая утратила такой остаток лизина (т.е. SEQ ID NO:61, где X отсутствует). Ниже приведены аминокислотные последовательности такой первой полипептидной цепи (SEQ ID NO:91) (подчеркнута последовательность домена VL из hmAb-D (SEQ ID NO:30))

DIQMTQSPSF LSASVGRVT ITCKASONVD TNVAWYQQPK GKAPKALIYS
 ASYRYSGVPS RFGSGSGGTD FTLTISSLPQ EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGQ
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGLTLVTSS ASTKGEVAAC
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFPY SDIAVEWESN GPENNYKTT
 PVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
 PGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Вторая полипептидная цепь примерного биспецифического трехцепочечного диатела DART-D3 B7-H3 x CD3 содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67); промежуточный спейсерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); домен VH из анти-B7-H3 антитела (hVH из mAb-D (SEQ ID NO:31), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)), цистеинсодержащий домен (К-спираль), способствующий гетеродимеризации (KVAACKK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:48)) и С-конец. Ниже представлена аминокислотная последовательность такой второй полипептидной цепи (SEQ ID NO:92) (подчеркнута последовательность домена VH из hmAb-D (SEQ ID NO:31))

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGLSLRLSC AASGFTFSSF
 GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SSGGTIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
 MNSLRAEDTA VYYCARHGYR YEGFDYWGGQ TTVTSSAST KGVAAACKK
 VAALKEKVAALKEKVAALKE

Третья полипептидная цепь примерного биспецифического трехцепочечного диатела DART-D3 B7-H3 x CD3 включает в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; спейсерный пептид (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:56)); несущий углубление домен IgG1 CH2-CH3 (SEQ ID NO:62); и С-конец. Полинуклеотиды, кодирующие этот полипептидную цепь может кодировать С-концевой остаток лизина SEQ ID NO:62 (т.е. X из SEQ ID NO:62), однако, как указывалось выше, этот остаток лизина может быть посттрансляционно удален в некоторых системах экспрессии. Соответственно, настоящее изобретение включает такую третью полипептидную цепь, которая содержит такой остаток лизина (т.е. SEQ ID NO:62., где X представляет собой лизин), а также третью полипептидную цепь, которая утратила такой остаток лизина (т.е. SEQ ID NO:62, где X отсутствует). Ниже представлена аминокислотная последовательность такой третьей полипептидной цепи (SEQ ID NO:93)

DKTHTCPPCP APEAAGGSPV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Понятно, что в свете изложенного в данном документе описания могут быть использованы различные доменные ориентации, домены VH, домены VL, линкеры и/или гетеродимеры, способствующие развитию, для получения альтернативных биспецифических трехцепочечных диател B7-H3 x CD3. В частности, можно использовать домен VH и домен VL из hmAb-C (SEQ ID NO:20-21).

С. Трехвалентные связывающие молекулы B7-H3 x CD3 x CD8.

Типичные трехвалентные связывающие молекулы B7-H3 x CD3 x CD8, имеющие один сайт связывания, специфичный для B7-H3 (содержащий родительский и/или гуманизированный домен анти-B7-H3-VL и соответствующий домен анти-B7-H3-VH, как описано выше), один сайт связывания, специфичный для CD3 (содержащий, например, домен VL из CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) и домен VH из анти-CD3-антитела (например, CD3 mAb 1 (D65G) (SEQ ID NO:68)) и один сайт связывания, специфичный для CD8 (содержащий, например, домены VH и VL из TRX2 (SEQ ID NO:75 и 76 соответственно). Такие трехвалентные связывающие молекулы могут иметь две полипептидные цепи (см., например, фиг. 6E и 6F), три полипептидные цепи (см., например, фиг. 6C и 6D), четыре полипептидные цепи (см., например, фиг. 6A

и 6В) или пять полипептидных цепей (см., например, фиг. 5).

Х. Способы получения.

В7-НЗ-связывающие молекулы по настоящему изобретению, наиболее предпочтительно получают посредством рекомбинантной экспрессии нуклеотидных молекул, которые кодируют такие полипептиды, как хорошо известно в данной области.

Полипептиды по изобретению могут быть легко получены с применением твердофазного пептидного синтеза (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis" *Science* 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century", *Mini Rev. Med. Chem.* 6(1):3-10).

В альтернативном варианте антитела могут быть получены рекомбинантно и экспрессированы с применением любого способа, известного в данной области. Антитела могут быть получены рекомбинантно сначала выделения антител, полученных из животных-хозяев, получения последовательности генов и использования последовательности генов для рекомбинантной экспрессии антитела в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другим способом, который может быть использован, является экспрессия последовательности антител в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Были раскрыты подходящие способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке (см., например, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants", *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", *Int. Rev. Immunol* 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies", *J. Immunol Methods* 231:147-157). Подходящие способы получения производных антител, например гуманизированные, одноцепочечные и т.д. известны в данной области и были описаны выше. В другом варианте антитела могут быть получены рекомбинантно с помощью технологии фагового дисплея (см., например, патенты США №№ 5565332, 5580717, 5733743, 6265150 и Winter G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology", *Annu. Rev. Immunol.* 12.433-455).

Векторы, содержащие интересующие полинуклеотиды (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептидные цепи В7-НЗ-связывающих молекул по настоящему изобретению), могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих средств, включая электропорацию, трансфекцию с применением хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию; и инфекцию (например, где вектор является инфекционным агентом, таким как вирус осповакцины). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов будет часто зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Любая клетка-хозяин, способная к сверхэкспрессии гетерологичных ДНК, может быть использована с целью экспрессии представляющего интерес полипептида или белка. Неограничивающие примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают, без ограничения указанным, клетки COS, HeLa и CHO.

Изобретение включает полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность В7-НЗ-связывающей молекулы по настоящему изобретению. Полипептиды по настоящему изобретению могут быть получены способами, известными в данной области. Полипептиды могут быть получены путем протеолитической или другой деградации антител рекомбинантными способами (т.е. одиночные или слитые полипептиды), как описано выше, или химическим синтезом. Полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды до около 50 аминокислот, обычно получают путем химического синтеза. Способы химического синтеза известны в данной области и являются коммерчески доступными.

Изобретение включает варианты В7-НЗ-связывающих молекул, включая функционально эквивалентные полипептиды, которые не оказывают существенного влияния на свойства таких молекул, а также варианты, которые обладают повышенной или пониженной активностью. Модификация полипептидов является обычной практикой в данной области и не нуждается в подробном описании в данном документе. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одну или несколько делеций или добавок аминокислот, которые не оказывают значительного вредного влияния на функциональную активность или применение химических аналогов. Аминокислотные остатки, которые могут быть консервативно замещены друг другом, включают, без ограничения указанным: глицин/аланин; серин/треонин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; лизин/аргинин; и фенилаланин/тирозин. Эти полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование различными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно, аминокислотные замены будут консервативными, т.е. замещенная аминокислота будет обладать такими же химическими свойствами, что и исходная аминокислота. Такие консервативные замены известны в данной области, и примеры были приведены выше. Модификации аминокислот могут варьировать от изменения или модификации одной или нескольких аминокислот до полной реорганизации участка, такого как вариабельный домен. Изменения в вариабельном домене могут изменять аффинность связывания и/или специфичность.

Другие способы модификации включают применение способов связывания, известных в данной области, включая, без ограничения указанным, ферментативные средства, окислительное замещение и хелатирование. Модификации могут использоваться, например, для прикрепления меток для иммуноанализа, таких как прикрепление радиоактивных компонентов для радиоиммунологического анализа. Модифицированные полипептиды получают с применением известных процедур в данной области, и они могут быть подвергнуты скринингу с применением стандартных анализов, известных в данной области.

Изобретение охватывает слитые белки, содержащие один или несколько анти-В7-Н3-VL и/или VH этого изобретения. В одном воплощении предусмотрен слитый полипептид, который включает легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую, так и тяжелую цепь. В другом воплощении слитый полипептид содержит константную область гетерологичного иммуноглобулина. В другом воплощении слитый полипептид содержит переменный домен с легкой цепью и домен с переменной длиной цепи антитела, продуцируемый из публично депонированной гибридомы. Для целей настоящего изобретения гибридный белок антитела содержит один или несколько полипептидных доменов, которые специфически связываются с В7-Н3 и другую аминокислотную последовательность, которой он не присоединен в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другого участка.

Настоящее изобретение, в частности, охватывает В7-Н3-связывающие молекулы (например, антитела, диатела, трехвалентные связывающие молекулы и т.д.), конъюгированные с диагностическим или терапевтическим компонентом. Для целей диагностики В7-Н3-связывающей молекулы по изобретению могут быть связаны с детектируемым веществом. Такие В7-Н3-связывающие молекулы полезны для мониторинга и/или прогнозирования развития или прогрессирования заболевания в рамках процедуры клинических испытаний, таких как определение эффективности конкретной терапии. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты (например, пероксидазу хрена, бета-галактозидазу и т.д.), простетические группы (например, авидин/биотин), флуоресцентные материалы (например, умбеллиферон, флуоресцеин или фикоэритрин), люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люцифераза или экворин), радиоактивные материалы (например, углерод-14, марганец-54, стронций-85 или цинк-65), позитронно-активные металлы и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. Поддающееся обнаружению вещество можно связать или конъюгировать либо непосредственно с В7-Н3-связывающей молекулой, либо опосредованно через интермедиат (например, линкер), используя методы, известные в данной области техники.

В терапевтических целях В7-Н3-связывающие молекулы по изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин (например, цитостатический или цитотоксичный агент), терапевтический агент или ион радиоактивного металла, например альфа-излучатель. Цитотоксин или цитотоксический агент включают любой агент, который вреден для клеток, таких как, например, экзотоксин синегнойной палочки, дифтерийный токсин, ботулинический токсин А-Е, рицин-абрин, сапорин и цитотоксические фрагменты таких агентов. Терапевтическое средство включает любое средство, имеющее терапевтический эффект для профилактического или терапевтического лечения расстройств. Такими терапевтическими агентами могут быть химические терапевтические агенты, белковые или полипептидные терапевтические агенты и включаются терапевтические агенты, которые обладают искомой биологической активностью и/или модифицируют данный биологический ответ. Примеры терапевтических агентов включают алкилирующие агенты, ингибиторы ангиогенеза, антимиотические агенты, агенты гормональной терапии и антитела, полезные для лечения клеточных пролиферативных нарушений. Терапевтический фрагмент может быть связан или конъюгирован либо непосредственно с В7-Н3-связывающей молекулой, либо опосредованно через интермедиат (например, линкер) с применением методов, известных в данной области.

XI. Конъюгаты лекарственного средства и антитела.

Настоящее изобретение относится к терапевтическим антителам против В7-Н3 человека (или к его В7-Н3-связывающим доменам) и, в частности, к любому из вышеописанных антител против В7-Н3 человека или к В7-Н3-связывающим доменам, которые конъюгированы с лекарственным средством (молекула "В7-Н3-ADC"). Такие В7-Н3-ADC усиливают цитотоксичность терапии против В7-Н3 человека, особенно при лечении рака. Как указано выше, молекулы В7-Н3-ADC по настоящему изобретению включают формулу



где Ab представляет собой антитело, которое связывается с В7-Н3, которое включает гуманизированный переменный домен тяжелой цепи (VH) и гуманизированный переменный домен легкой цепи (VL) или является его В7-Н3-связывающим фрагментом;

D представляет собой цитотоксический лекарственный компонент;

LM представляет собой связь или линкерную молекулу, которая ковалентно связывает Ab и D;

m представляет собой целое число от 0 до n и обозначает количество линкерных молекул в В7-Н3-ADC;

n представляет собой целое число от 1 до 10 и обозначает количество цитотоксических лекарственных компонентов, ковалентно связанных с молекулой В7-Н3-ADC.

В предпочтительных воплощениях B7-H3-ADC будет связываться с опухолевой клеткой, экспрессирующей B7-H3, и затем будет интернализован в такую клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Оказавшись внутри лизосомы B7-H3-ADC будет предпочтительно деградировать, чтобы тем самым вызвать высвобождение цитотоксического лекарственного компонента внутри клетки, что приведет к гибели клеток. Как будет понятно, механизм действия гибели клеток может варьировать в зависимости от используемого класса цитотоксического лекарственного средства (например, нарушения цитокинеза ингибиторами тубулиновой полимеризации, такими как майтанзины и ауристатины, повреждение ДНК взаимодействующими с ДНК агентами, такими как калихеамицины и дуокармицины) и др. Соседние раковые клетки также могут быть уничтожены, когда свободное лекарственное средство высвобождается в опухолевую среду умирающей клеткой в процессе, известном как эффект наблюдателя (Panowski, S. et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy", *mAbs* 6(1):34-45; Kovtun, Y.V. et al. (2006) "Antibody-Drug Conjugates Designed To Eradicate Tumors With Homogeneous And Heterogeneous Expression Of The Target Antigen", *Cancer Res.* 66:3214-3221).

B7-H3-ADC по настоящему изобретению может содержать домен Fc, который может быть природным доменом Fc, или может иметь последовательность, которая обладает одним или более отличиями от встречающегося в природе домена Fc, и который может быть полным доменом Fc, (например, полным доменом Fc из IgG) или только частью полного домена Fc. Такие домены Fc могут быть любого изотипа (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). Такой домен Fc может включать или не включать C-концевой остаток лизина в домене CH3. B7-H3-ADC по настоящему изобретению может дополнительно включать домен CH1 и/или шарнирный домен. В случае наличия, домен CH1 и/или шарнирный домен могут быть любого изотипа (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и предпочтительно будут иметь тот же изотип, что и искомый домен Fc.

А. Типичные линкерные молекулы изобретения.

Изобретение, таким образом, в частности, предусматривает такие B7-H3-ADC, в котором линкерная молекула LM отсутствует (т.е. $m = 0$), и B7-H3-ADC, которые обладают более чем одной линкерной молекулой LM (т.е. m представляет собой целое число от 2 до n , где n представляет собой целое число от 2 до 10), при этом каждая из линкерных молекул LM ковалентно связывает D цитотоксический лекарственный компонент D с Ab, таким как B7-H3-ADC.

Изобретение далее обеспечивает B7-H3-ADC, Ab которых ковалентно связан с более чем одной линкерной молекулой LM, где все такие линкерные молекулы идентичны. Цитотоксические лекарственные компоненты D, которые ковалентно связаны с Ab таких B7-H3-ADC, могут быть все одинаковыми или могут включать 2, 3, 4, или более независимо различных цитотоксических лекарственных компонентов D.

Кроме того, настоящее изобретение относится к таким B7-H3-ADC, чьи Ab ковалентно связаны с более чем одной линкерной молекулой LM, где все такие линкерные молекулы не идентичны и могут независимо отличаться. Цитотоксические лекарственные компоненты D, которые ковалентно связаны с Ab такого B7-H3-ADC, могут быть все одинаковыми или могут включать 2, 3, 4, или более независимо различных цитотоксических лекарственных компонентов D.

Примерные гуманизированные домены VH и VL антител, которые связываются с B7-H3 человека, и примерные константные домены человеческого антитела, которые могут быть включены в B7-H3-ADC по изобретению, приведены выше. Как указано выше, B7-H3-ADC по изобретению дополнительно включает по меньшей мере один цитотоксический лекарственный компонент, который предпочтительно ковалентно связан с атомом боковой цепи аминокислотного остатка такого домена VH или домена VL и/или константного домена, либо непосредственно, либо через линкерную молекулу, интеркалированную между атомом боковой цепи и лекарственным компонентом. Линкерная молекула может быть непептидной молекулой или молекулой, которая включает непептидную часть и пептидную часть, или она может быть молекулой, которая состоит исключительно из аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки любых таких линкерных молекул могут содержать природные или неприродные аминокислотные остатки, включая D-варианты встречающихся в природе аминокислотных остатков, *p*-ацетилфенилаланин, селеноцистеин и т.д. Необязательно или дополнительно конкретные остатки, имеющие искомую боковую цепь (например, боковую цепь $-CH_2-SH$, боковую цепь $-CH_2-OH$, боковую цепь $-CH(CH_2)-SH$, $-CH_2-CH_2-S-CH_3$, боковую цепь $-CH_2-C(O)-NH_2$, боковую цепь $-CH_2-CH_2-C(O)-NH_2$, боковую цепь $-CH_2-C(O)OH$, боковую цепь $CH_2-CH_2-C(O)OH$, боковую цепь $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$, боковую цепь $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH_2)_2$, боковую цепь имидазола, бензильную боковую цепь, боковую цепь фенола, боковую цепь индола и т.д.) могут быть введены в конструкцию B7-H3-ADC по изобретению.

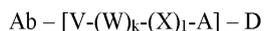
Линкерная молекула может быть не расщепляемой в физиологических условиях, например, состоящей из гидролитически стабильного фрагмента, например тиоэфирного линкера или экранированного дисульфидного линкера. Гидролитически стабильные линкеры по существу стабильны в воде и не реагируют с водой при полезных значениях pH, включая, без ограничения указанных, физиологические условия в течение длительного периода времени. Напротив, гидролитически нестабильные или разлагающиеся линкеры деградируют в воде или в водных растворах, включая, например, кровь.

В ином случае, линкерная молекула может быть расщепляемой или может содержать расщепляе-

мую часть. Примеры такой расщепляемой части включают кислотно-лабильный линкер (например, линкер 4-(4'-ацетилфенокси) бутановой кислоты, который образует гидразиновую связь), расщепляемый дисульфидный линкер (который расщепляется в восстановительной внутриклеточной среде) и протеазорасщепляемый линкер. Кислотно-лабильные линкеры рассчитаны на стабильность при уровнях pH, встречающихся в крови, но становятся неустойчивыми и деградируют, когда встречается среда с низким pH в лизосомах. Протеазорасщепляемые линкеры также предназначены для стабилизации в крови/плазме, но быстро высвобождают свободное лекарственное средство внутри лизосом в раковых клетках при расщеплении лизосомными ферментами (Panowski, S. et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy", mAbs 6(1):34-45). В ином случае, линкерная молекула может быть фермент-расщепляемым субстратом или содержать фермент-расщепляемый субстрат, такой как расщепляемый пептид (например, расщепляемый дипептид, такой как дипептид валин-цитруллин линкер парааминобензилового спирта (сAC10-mc-vc-PABA), который селективно расщепляется лизосомными ферментами). Подходящие расщепляемые линкеры известны в данной области техники, см., например, de Groot, Franciscus M.H., et al. (2002) "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Dual Tumor-Specific Motive Containing Integrin-Targeted Plasmin-Cleavable Doxorubicin Prodrug", Molecular Cancer Therapeutics, 1: 901-911; Dubowchik et al., (2002) "Doxorubicin Immunoconjugates Containing Bivalent, Lysosomally-Cleavable Dipeptide Linkages", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:1529-1532; пат. США №№ 5547667; 6214345; 7585491; 7754681; 8080250; 8461117 и WO 02/083180.

Могут использоваться ферментативно нестабильные или деградирующие линкеры. Такие линкеры деградируют одним или несколькими ферментами. Например, PEG и родственные полимеры могут включать деградируемую молекулу(ы) линкера в полимерной основной цепи или в линкерной группе между полимерной основой и одной или несколькими концевыми функциональными группами полимерной молекулы. Такая деградируемая линкерная молекула(ы) включают, без ограничения указанным, сложноэфирные связи, образованные реакцией PEG-карбоновых кислот или активированных PEG-карбоновых кислот со спиртовыми группами на биологически активном веществе, где такие сложноэфирные группы обычно гидролизуются в физиологических условиях до высвобождения биологически активного агента. Другие гидролитически деградируемые линкерные молекулы включают, без ограничения указанным, карбонатные связи; иминовые связи, образующиеся в результате взаимодействия амина и альдегида; фосфатные сложные эфиры, образующиеся при взаимодействии спирта с фосфатной группой; гидразоновые связи, которые являются продуктом реакции гидразида и альдегида; ацетальные связи, которые являются продуктом реакции альдегида и спирта; ортоэфирные связи, которые являются продуктом реакции формиата и спирта; пептидные связи, образованные аминокислотой, включая, без ограничения указанным, на конце полимера, такого как PEG, и карбоксильную группу пептида; и олигонуклеотидные связи, образованные фосфорамидитной группой, включая, без ограничения указанным, на конце полимера и 5'-гидроксильной группе олигонуклеотида.

В одном воплощении линкерная молекула по настоящему изобретению может представлять собой, или может включать, отщепляемую линкерную молекулу, V-(W)_k-(X)_l-A, как описано в публикации РСТ WO 02/083180, которая имеет формулу



где V является необязательным отщепляемым компонентом;

(W)_k-(X)_l-A - удлиненная самоэлиминирующаяся спейсерная система, которая самоэлиминируется а 1_l(4+2n)-элиминацией;

W и X каждый представляют собой спейсер каскада электронов a_l(4+2n), являющиеся одинаковыми или различными;

A представляет собой либо спейсерную группу формулы (Y)_m, где Y представляет собой a_l(4+2n) спейсер каскада электронов, или группу формулы U, являющуюся спейсером циклизации-элиминации;

k, l и m независимо представляют собой целое число от 0 (включительно) до 5 (включительно);

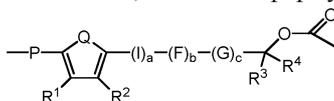
n представляет собой целое число от 0 (включительно) до 10 (включительно);

при условии, что: когда A равно (Y)_m: тогда k + l + m ≥ 1, и

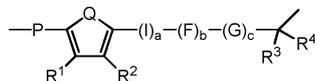
если k + l + m = 1, то n > 1;

когда A равно U, тогда k + l ≥ 1;

W, X и Y независимо выбран из соединений, имеющих формулу



или формулу

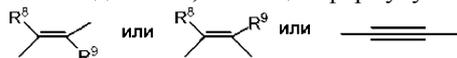


где Q представляет собой -R⁵C=CR⁶-, S, O, NR⁵, -R⁵C=N- или -N=CR⁵-;

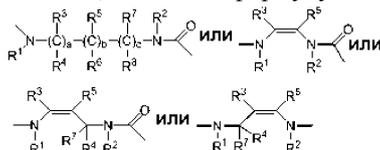
P представляет собой NR⁷, O или S;

a, b и c независимо представляют собой целое число от 0 (включительно) до 5 (включительно);

I, F и G независимо выбраны из соединений, имеющих формулу



где $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ и R^9 независимо представляют собой H, C_{1-6} алкил, C_{3-20} гетероцикл, C_{5-20} арил, C_{1-6} алкокси, гидроксид (OH), амино (NH_2), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино ($NR_x^1R_x^2$), нитро (NO_2), галоген, CF_3 , CN, $CONH_2$, SO_2Me , $CONHMe$, циклический C_{1-5} алкиламино, имидазолил, C_{1-6} алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси ($COOH$), карбоксилат ($COOR_x$), сульфокси ($S(=O)_2OH$), сульфонат ($S(=O)_2OR_x$), сульфонил ($S(=O)_2R_x$), сульфоксид ($S(=O)OH$), сульфид ($S(=O)R_x$), сульфидил ($S(=O)R_x$), фосфонокси ($OP(=O)(OH)_2$) и фосфат ($OP(=O)(OR_x)_2$), R_x^1 и R_x^2 независимо выбраны из C_{1-6} алкильной группы, C_{3-20} гетероциклической группы или C_{5-20} арильной группы, двух или более заместителей $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ или R^9 необязательно связанных друг с другом с образованием одной или нескольких алифатических или ароматических циклических структур; U выбран из соединений, имеющих формулу



где a, b и c независимо выбраны как целое число 0 или 1; при условии, что $a + b + c = 2$ или 3;

R^1 и/или R^2 независимо представляют собой H, C_{1-6} алкил, причем указанный алкил необязательно замещен одной или несколькими из следующих групп: гидроксид (OH), простой эфир (OR_x), амино (NH_2), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино ($NR_x^1R_x^2$), нитро (NO_2), галоген, CF_3 , CN, $CONH_2$, SO_2Me , $CONHMe$, циклический C_{1-5} алкиламино, имидазолил, C_{1-6} алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси ($COOH$), карбоксилат ($COOR_x$), сульфокси ($S(=O)_2OH$), сульфонат ($S(=O)_2OR_x$), сульфонил ($S(=O)_2R_x$), сульфоксид ($S(=O)OH$), сульфид ($S(=O)R_x$), сульфидил ($S(=O)R_x$), фосфонокси ($OP(=O)(OH)_2$) и фосфат ($OP(=O)(OR_x)_2$), где R_x, R_x^1 и R_x^2 выбраны из C_{1-6} алкильной группы, C_{3-20} гетероциклической группы или C_{5-20} арильной группы; и

R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 и R^8 независимо представляют собой H, C_{1-6} алкил, C_{3-20} гетероцикл, C_{5-20} арил, C_{1-6} алкокси, гидроксид (OH), амино (NH_2), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино ($NR_x^1R_x^2$), нитро (NO_2), галоген, CF_3 , CN, $CONH_2$, SO_2Me , $CONHMe$, циклический C_{1-5} алкиламино, имидазолил, C_{1-6} алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси ($COOH$), карбоксилат ($COOR_x$), сульфокси ($S(=O)_2OH$), сульфонат ($S(=O)_2OR_x$), сульфонил ($S(=O)_2R_x$), сульфоксид ($S(=O)OH$), сульфид ($S(=O)R_x$), сульфидил ($S(=O)R_x$), фосфонокси ($OP(=O)(OH)_2$) и фосфат ($OP(=O)(OR_x)_2$), где R_x, R_x^1 и R_x^2 выбраны из C_{1-6} алкильной группы, C_{3-20} гетероциклической группы или C_{5-20} арильной группы и два или более заместителей $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$, или R^8 необязательно связаны друг с другом с образованием одной или нескольких алифатических или ароматических циклических структур.

Типичные молекулы включают

- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- п-аммоциннамиллоксикарбонил;
- п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил;
- п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил;
- п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил;
- п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил;
- п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил;
- п-аминобензилоксикарбонил (метиламин)этил(метиламин)карбонил;
- п-аминоциннамиллоксикарбонил (метиламин)этил(метиламин)карбонил;
- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил(метиламин)этил(метиламин)карбонил;
- п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил(метиламин)этил(метиламин)карбонил;
- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил(метиламин)этил(метиламин)карбонил;
- п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил(метиламин)этил(метиламин)карбонил;
- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензил;
- п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензил;
- п-аминоциннамил;
- п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминобензил;

п-аминобензилоксикарбонил-п-амиоциннамил;
 п-амино-циннамил-оксикарбонил-п-амиоциннамил;
 п-аминофенилпентадиенил;
 п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-амиоциннамил;
 п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-амиобензил;
 п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-амиофенилпентадиенил.

В некоторых воплощениях В7-Н3-ADC по изобретению содержит две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять цитотоксических лекарственных компонентов, которые могут быть одинаковыми или могут независимо быть одинаковыми или отличными от другого цитотоксического лекарственного компонента В7-Н3-ADC. В одном воплощении каждый такой фрагмент цитотоксического лекарственного компонента конъюгирован с Ab из В7-Н3-ADC по изобретению посредством отдельной линкерной молекулы. В ином случае, более чем один цитотоксический лекарственный компонент может быть присоединен к Ab из В7-Н3-ADC по изобретению через одну и ту же линкерную молекулу.

Цитотоксические лекарственные части могут быть конъюгированы с Ab из В7-Н3-ADC по изобретению известными в данной области способами (см., например, Yao, H. et al. (2016) "Methods to Design and Synthesize Antibody-Drug Conjugates (ADC)", *Intl. J. Molec. Sci.* 17(194): 1-16); Behrens, C.R. et al. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies", *mAbs* 6(1):46-53; Bouchard, H. et al. (2014) "Antibody-Drug Conjugates - A New Wave Of Cancer Drugs", *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett* 24:5357-5363). Тиольная группа цистеина, аминогруппа лизина, глутамина или аргинина или карбоксильная группа глутамата или аспартата могут быть использованы для конъюгации линкерной молекулы-цитотоксического лекарственного компонента (LM-D) с Ab из В7-Н3-ADC по изобретению. Нативные антитела содержат многочисленные сайты конъюгации с лизином и, таким образом, способны связывать множество конъюгированных молекул на антитело. Действительно, картирование пептида определило, что конъюгация происходит как на тяжелой, так и на легкой цепи около на 20 различных лизиновых остатках (40 лизинов на mAb). Таким образом, может генерироваться более одного миллиона различных видов ADC. Конъюгирование с цистеином происходит после восстановления от одной до четырех межцепочечных дисульфидных связей, и поэтому в нативных доменах VL и VH конъюгация ограничена восемью экспонированными сульфгидрильными группами. Однако при желании дополнительные реактивные остатки (например, лизин, цистеин, селеноцистеин и т.д.) могут быть введены в антитела (например, в пределах домена VL и/или домена VH и/или константного домена). Например, один или несколько природных аминокислотных остатков могут быть замещены остатком цистеина. Неестественная аминокислота (например, п-ацетилфенилаланин), может быть генетически введена в антитело с применением ингибитора стоп-кодона янтарь парой супрессирующей тРНК/aaRS; (см., например, Behrens C.R., and Liu B. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies", *mAbs* 6(1):46-53. doi:10.4161/mabs.26632; Panowski, S., et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy", *mAbs*, 6(1), 34-45, doi:10.4161/mabs.27022 и WO 2008/070593). В ином случае, или дополнительно, ферменты (например, гликотрансфераза) могут быть использованы для конъюгации линкерной молекулы-цитотоксического лекарственного компонента (LM-D) с Ab из В7-Н3-ADC по изобретению. Платформа гликотрансферазы присоединяет сахарный компонент к сайту гликозилирования на антителе (например, в положении N297 домена Fc антитела IgG человека), который затем может служить в качестве линкерной молекулы по настоящему изобретению и конъюгировать цитотоксический лекарственный компонент (D) к Ab из В7-Н3-ADC по изобретению. В ином случае, транслгутаминаза может быть использована для каталитического образования ковалентной связи между свободной аминогруппой и боковой цепью глутамина.

Предпочтительной для этой цели является коммерчески доступная транслгутаминаза из *Streptovorticillium mobaraense* (mTG) (Pasternack, R. et al. (1998) "Bacterial Pro-Transglutaminase From *Streptovorticillium mobaraense* - Purification, Characterisation And Sequence Of The Zymogen", *Eur. J. Biochem.* 257(3):570-576; Yokoyama, K. et al. (2004) "Properties And Applications Of Microbial Transglutaminase", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:447-454). Этот фермент не распознает любые природные остатки глутамина в домене Fc гликозилированных антител, но распознает тетрапептид LLQL (SEQ ID NO:94) (Jeger, S. et al. (2010) "Site-Specific And Stoichiometric Modification Of Antibodies By Bacterial Transglutaminase", *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 49:9995-9997), который может быть введен в домен VL и/или домен VH и/или константный домен. Такие соображения рассматриваются Panowski, S. et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy", *mAbs* 6(1):34-45.

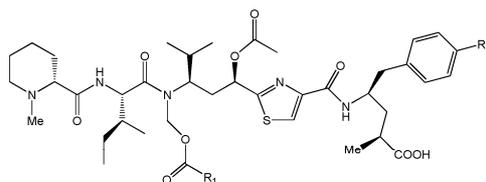
В. Типичные цитотоксические лекарственные компоненты по изобретению.

В некоторых воплощениях цитотоксический лекарственный компонент В7-Н3-ADC по изобретению включает цитотоксин, радиоизотоп, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормонов, фермент, олигонуклеотид, молекулу ДНК, молекулу РНК, молекулу мРНК, молекулу РНКи, молекулу микроРНК, фотоактивный терапевтический агент, антиангиогенный агент, проапоптотический агент, пептид, липид, углевод, хелатирующий агент или их комбинацию.

1. Цитотоксические лекарственные компоненты тубулизина.

В7-Н3-ADC согласно изобретению может включать цитотоксический лекарственный компонент

тубулизин



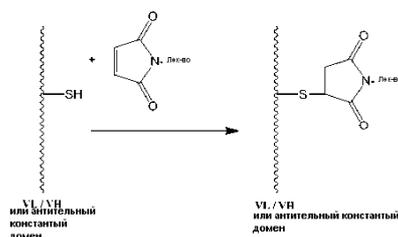
Производные	R1	R2
Тубулизин		
Тубулизин А	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	ОН
Тубулизин В	CH(CH ₃) ₂	ОН
Тубулизин С	CH ₂ CH ₃	ОН
Тубулизин D	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H

Тубулизины являются представителями класса натуральных продуктов, выделенных из миксобактериальных видов (Sasse et al. (2000) "Tubulysins, New Cytostatic Peptides From Myxobacteria Acting On Microtubuli. Production, Isolation, Physico-Chemical And Biological Properties", J. Antibiot. 53:879-885). В качестве взаимодействующих с цитоскелетом агентов тубулизины представляют собой митотические яды, которые ингибируют полимеризацию тубулина и приводят к остановке клеточного цикла и апоптозу (Steinmetz et al. (2004) "Isolation, Crystal And Solution Structure Determination, And Biosynthesis Of Tubulysins--Powerful Inhibitors Of Tubulin Polymerization From Myxobacteria", Chem. Int. Ed. 43:4888-4892; Khalil et al. (2006) "Mechanism Of Action Of Tubulysin, An Antimitotic Peptide From Myxobacteria", ChemBioChem. 7:678-683; Kaur et al. (2006) "Biological Evaluation Of Tubulysin A: A Potential Anticancer And Antiangiogenic Natural Product", Biochem. J. 396: 235-242). Тубулизины являются чрезвычайно мощными цитотоксическими молекулами, активность ингибирования которыми роста клеток превышает активность любого клинически значимого традиционного химиотерапевтического средства, например, эпитолонов, паклитаксела и винбластина. Кроме того, они являются эффективными против клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью (Domling, A. et al. (2005) "Myxobacterial Epothilones And Tubulysins As Promising Anticancer Agents", Mol. Diversity 9:141-147). Эти соединения демонстрируют высокую цитотоксичность, протестированную против панели раковых линий с величинами IC₅₀ в низком пиколярном диапазоне; таким образом, они представляют интерес в качестве противоопухолевой терапии; см., например, WO 2012/019123, WO 2015/157594. Конъюгаты тубулизина раскрыты, например, в пат. США № 7776814. В некоторых воплощениях молекула тубулизина или его производное представляет собой пролекарство.

2. Цитотоксические лекарственные компоненты ауристатина.

Альтернативно или дополнительно B7-H3-ADC по изобретению может включать цитотоксический лекарственный компонент ауристатин, (например, MMAE (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-норэфедрин) и MMAF (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-фенилаланин). Доластатины первоначально были обнаружены как компоненты морского зайца *Dolabella auricularia* и были модифицированы для получения производных, также известных как ауристатин (например, монометилауристатин E и F). Доластатины и ауристатины взаимодействуют с сайтом связывания алкалоидов барвинка с α -тубулином и блокируют его полимеризацию. Показано, что они влияют на динамику микротрубочек, гидролиз GTP и ядерное и клеточное деление (Woyke et al., Antimicrob. Agents and Chemother. 45:3580-3584 (2001)) и имеют противоопухолевую активность (пат. США №№ 5663149, 6884869, 7964566). Лекарственный компонент ауристатина может быть присоединен к антителу через N-(амино)конец или C-(карбокси)конец пептидного лекарственного фрагмента (см., например, WO 2002/088172). В некоторых воплощениях молекула, вариант или производное ауристатина или доластатина представляет собой пролекарство. MMAE может быть конъюгирован с белком путем модификации тиолов боковой цепи цистеина (Senter, P.D. et al. (2012) "The Discovery And Development Of Brentuximab Vedotin For Use In Relapsed Hodgkin Lymphoma And Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma", Nat. Biotechnol. 30:631-637; van de Donk, N.W. et al. (2012) "Brentuximab vedotin", MAbs 4:458-465). Этот способ включает восстановление одной или нескольких дисульфидных связей, экспонированных растворителю цистеиновых остатков, с помощью восстанавливающего агента (например, дитиотреитола (DTT) или трис-(2-карбоксиил)фосфина (TCEP)) с последующей модификацией полученных тиолов с помощью малеимид-содержащего лекарственного средства (см., Behrens, C.R. et al. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies", mAbs 6(1):46-53).

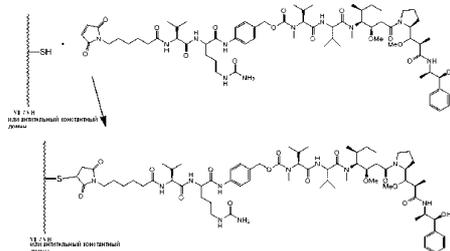
Схема 1



Типичное цитотоксическое лекарственное средство, которое может быть конъюгировано таким об-

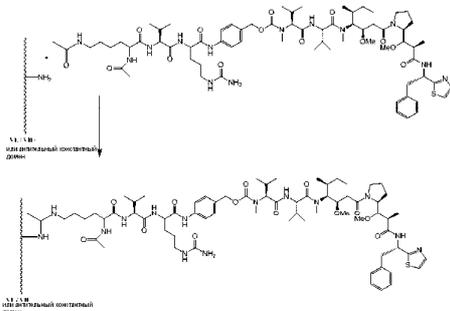
разом, включает сайт25 расщепления протеазой катепсином В (VC: валин, цитруллин) и саморасщепляющийся линкер (PAB: парааминобензилоксикарбонил) между малеимидной группой (MC: малеимидо-капроил) и цитотоксическим лекарственным средством (MMAE) (Doronina, SO et al. (2003) "Development Of Potent Monoclonal Antibody Auristatin Conjugates For Cancer Therapy", Nat. Biotechnol. 21:778-784).

Схема 2. Синтез MC-VC-PAB-MMAE



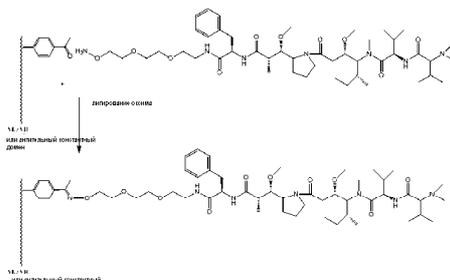
В ином случае, фрагмент ауристин-цитотоксического лекарственного фрагмента может представлять собой AcLys-VC-PAB-MMAD (ацетилсилилвалинцитруллин-п-аминобензилоксикарбонилмоно-метилдоластатин), который может быть конъюгирован с группой NH₂ боковой цепи глутаминового остатка в домене VL и/или домене VH и/или константном домене части Ab из B7-H3-ADC по изобретению с применением фермента, микробной транслугаминазы, для того, чтобы катализировать сайт-специфическую реакцию между боковой цепью ацетилированного остатка лизина и боковыми цепями глутамина:

Схема 3



В ином случае, п-ацетилфенилаланин может быть включен в домен VL и/или домен VH и/или константный домен части Ab в B7-H3-ADC согласно изобретению, а затем использован для конъюгации ауристина F-оксиамина с таким доменом путем лигирования оксима.

Схема 4

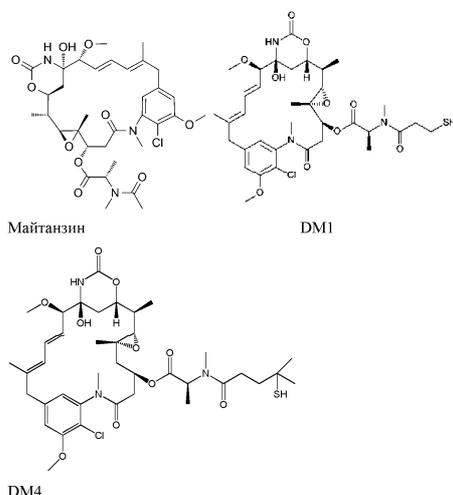


3. Майтанзиноидные цитотоксические лекарственные компоненты.

B7-H3-ADC по изобретению может альтернативно или дополнительно включать майтанзиноидный цитотоксический лекарственный компонент, например, антибиотик ансамицин, характеризующийся 19 членной структурой ансамacroлида, присоединенной к хлорзамещенному бензольному кольцу хромофора. Майтанзиноиды-митотические ингибиторы, которые действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин изначально был выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 386111). Было обнаружено, что некоторые микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзиол и сложные эфиры майтанзинола C-3 (патент США № 4151042). Синтетический майтанзиол и его производные и аналоги раскрыты, например, в пат. США №№ 4137230 и 4248870. Майтанзиновые лекарственные компоненты являются привлекательными лекарственными компонентами в конъюгатах лекарственных средств и антител, поскольку они: (i) относительно доступны для получения путем ферментации или химической модификации, дериватизации продуктов ферментации, (ii) поддаются дериватизации с функциональными группами, подходящими для конъюгации через недисульфидные линкеры с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны против множества линий опухолевых клеток. Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение, раскрыты, например, в пат. США №№ 5202020 и 5416064 и европейском патенте EP 0425235B1; Liu, C. et al. (1996) "Eradication Of Large Colon Tumor Xenografts By Targeted De-

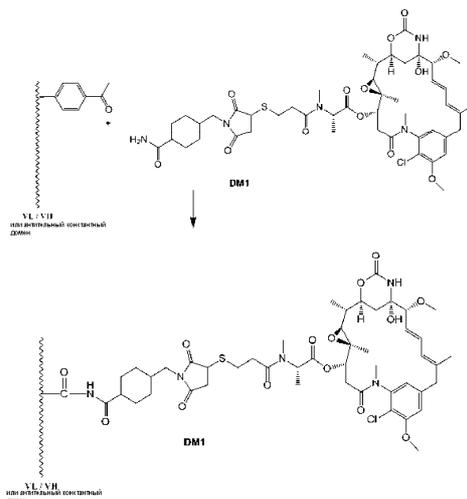
livery Of Maytansinoids", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 8618-8623 (описанные иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначенный DM1) и Chari, RV et al. (1992) "Immunoconjugates Containing Novel Maytansinoids: Promising Anticancer Drugs", Cancer Research 52:127-131.

Майтанзин, DM1 и DM4 являются образцовыми майтанзиноидными цитотоксическими лекарственными компонентами



Майтанзин может быть конъюгирован с Ab-частью B7-H3-ADC по изобретению путем реакции с боковой цепью лизина или глутамина. DM1 и DM4 может быть конъюгирован с COOH боковой цепи остатка глутамата или аспартата домена VL и/или домена VH и/или константного домена части Ab из B7-H3-ADC по изобретению (см., Behrens, C.R. et al. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies", mAbs 6(1):46-53; Bouchard, H. et al. (2014) "Antibody-Drug Conjugates - A New Wave Of Cancer Drugs", Bioorganic & Medicinal Chem. Lett 24:5357-5363).

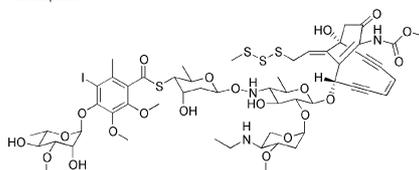
Схема 5



Трастузумаб эмтанзин (адо-трастузумаб эмтанзин, T-DM1, торговое название KADCYLA®) представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства, состоящее из моноклонального антитела трастузумаба (HERCEPTIN®), конъюгированного с майтанзиноидом мертанзином (DM1); см., например, LoRusso et al. (2011) "Trastuzumab Emtansine: A Unique Antibody-Drug Conjugate In Development For Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Cancer", Clin. Cancer Res. 20:6437-6447. Разработанный тио-трастузумаб-DM1 ADC также описан в Junutual et al. (2010) "Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate With An Improved Therapeutic Index To Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer", Clin, Cancer Res. 16:4769-4778. В некоторых воплощениях молекула майтанзиноида, его вариант или производное представляет собой пролекарство.

4. Цитотоксические лекарственные фрагменты калихеамицина.

B7-H3-ADC по изобретению может альтернативно или дополнительно включать цитотоксический лекарственный компонент калихеамицина

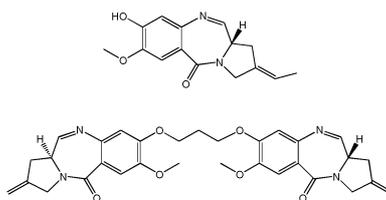


Описанные конъюгаты антител на основе калихеамицина являются дисульфидными вариантами исходного соединения трисульфида. До сих пор сообщалось о двух стратегиях соединения с диметил-гидразидом N-ацетил-с-калихеамицина (CalichDMH): (i) с гидразидом и (ii) с амидным сочетанием (Bouchard, H. et al. (2014) "Antibody-Drug Conjugates - A New Wave Of Cancer Drugs", *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett* 24:5357-5363).

Семейство калихеамициновых эндиновых противоопухолевых антибиотиков способно производить разрывы двухцепочечной ДНК в субпиколярных концентрациях. Калихеамицины представляют собой класс эндиновых антибиотиков, полученных из бактерии *Micromonospora echinospora*, причем наиболее важным является калихеамицин γ 1. Другими калихеамицинами являются β 1Br, γ 1Br, α 2I, α 3I, β 1I, γ 1I и Δ 1I (см. Lee, M.D. et al. (1989) "Calicheamicins, A Novel Family Of Antitumor Antibiotics. 3. Isolation, Purification And Characterization Of Calicheamicins Beta 1Br, Gamma 1Br, Alpha 2I, Alpha 3I, Beta 1I, Gamma 1I And Delta 1I", *J. Antibiotics* 42(7): 1070-1087). Для получения конъюгатов семейства калихеамицина см. пат. США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 577001 и 5877296. Структурные аналоги калихеамицина, которые могут быть использованы, включают, без ограничения указанным, γ 1III, α 2I, α 3I, N-ацетил- γ 1I, PSAG и θ 11 (Hinman et al. (1993) "Preparation And Characterization Of Monoclonal Antibody Conjugates Of The Calicheamicins: A Novel And Potent Family Of Antitumor Antibiotics", *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al. (1998) "Targeted Therapy With A Novel Eneidyene Antibiotic Calicheamicin Theta(1)1 Effectively Suppresses Growth And Dissemination Of Liver Metastases In A Syngeneic Model Of Murine Neuroblastoma", *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)). В некоторых воплощениях молекула, вариант или производное калихеамицина представляет собой пролекарство.

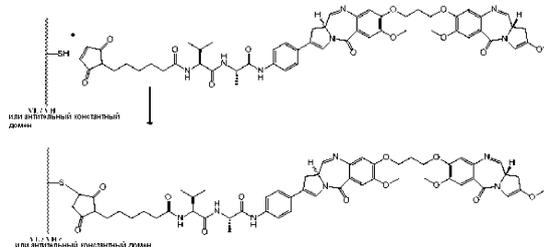
5. Цитотоксические лекарственные компоненты пирролобензодиазепина.

B7-H3-ADC согласно изобретению может включать альтернативно или дополнительно лекарственный компонент пирролобензодиазепина (например, природный пирролобензодиазепин и SJG-136, его производное)



Предпочтительным пирролобензодиазепиновым лекарственным компонентом является вадастуксимаб талирин (SGN-CD33A, Seattle Genetics).

Схема 6



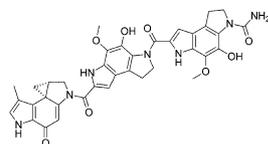
Пирролобензодиазепины (PBD) представляют собой класс натуральных продуктов с антибиотической или противоопухолевой активностью. В природе они продуцируются актиномицетами. Они являются соединениями, алкилирующими ДНК, а некоторые являются селективными к последовательности. Ряд PBD и их производных известны в данной области, например, димеры PBD (например, SJG-136 или SG2000), C2-ненасыщенные димеры PBD, димеры пирролобензодиазепина, содержащие C2-арильные замены (например, SG2285) лекарственное средство, которое активируется гидролизом (например, SG2285) и полипиррол-PBD (например, SG2274). PBD описаны далее в WO 2000/012507, WO 2007/039752, WO 2005/110423, WO 2005/085251 и WO 2005/040170 и WO 2014/057119. В некоторых воплощениях молекула, вариант или производное PBD представляет собой пролекарство.

6. Цитотоксические лекарственные компоненты дуокармицина.

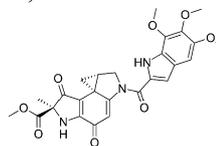
B7-H3-ADC по изобретению может альтернативно или дополнительно включать лекарственный фрагмент дуокармицина. Дуокармицины являются представителями ряда родственных натуральных продуктов, впервые выделенных из бактерий *Streptomyces*, и представляют собой мощные противоопухолевые антибиотики (см. Dokter, W. et al. (2014) "Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform", *Mol. Cancer Ther.* 13(11):2618-2629; Boger, D.L. et al. (1991). "Duocarmycins - A New Class Of Sequence Selective DNA Minor Groove Alkylating Agents", *Chemtracts: Organic Chemistry* 4 (5): 329-349 (1991); Tercel et al. (2013) "The Cytotoxicity Of Duocarmycin Analogues Is Mediated Through Alkylation Of DNA, Not Aldehyde Dehydrogenase 1: A Comment", *Chem. Int. Ed. Engl.* 52(21):5442-5446; Boger, D.L. et al. (1995) "CC-1065 And The Duocarmycins: Unraveling The Keys To A New Class Of Naturally Derived DNA Alkylating Agents", *Proc.*

Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92(9):3642-3649; Cacciari, B. et al. (2000) "CC-1065 And The Duocarmycins: Recent Developments", Expert Opinion on Therapeutic Patents 10(12): 1853-1871.

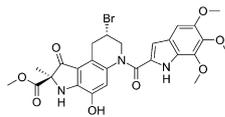
Природные дуокармицины включают дуокармицин А, дуокармицин В1, дуокармицин В1, дуокармицин В1, дуокармицин С2, дуокармицин D, дуокармицин SA и CC-1065 (публикация PCT № WO 2010/062171, Martin, D.G. et al. (1980) "Structure Of CC-1065 (NSC 298223), A New Antitumor Antibiotic", J. Antibiotics 33:902-903; Boger, D.L. et al. (1995) "CC-1065 And The Duocarmycins: Unraveling The Keys To A New Class Of Naturally Derived DNA Alkylating Agents", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:3642-3649).



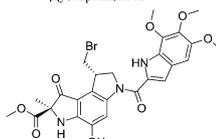
CC-1065



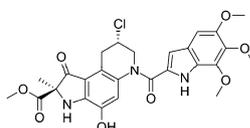
Дуокармицин А



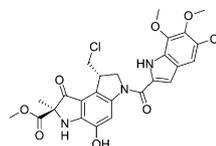
Дуокармицин В1



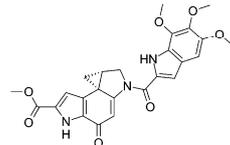
Дуокармицин В2



Дуокармицин С1

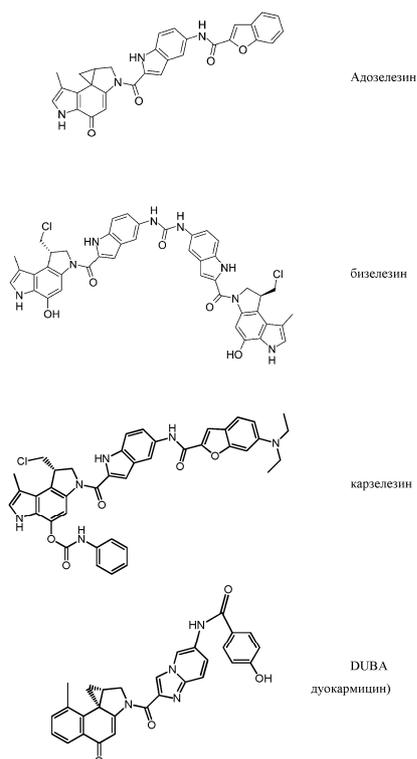


Дуокармицин С2

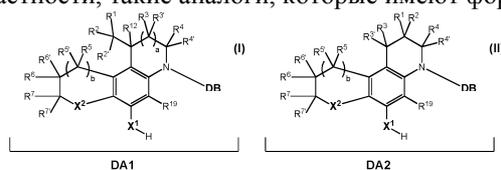


Дуокармицин SA

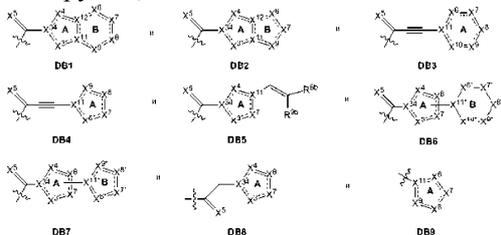
Подходящие синтетические аналоги дуокармицина включают адозелезин, бизелезин, карцезелин (U-80244) и спиро-дуокармицин (DUBA) (Dokter, W. et al. (2014) "Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform" Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629; Elgersma, R.C. et al. (2014) "Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985", Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835)



Дополнительные синтетические аналоги дуокармицина включают те, которые раскрыты в публ. РСТ № WO 2010/062171 и, в частности, такие аналоги, которые имеют формулу



или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или сольват, где DB является ДНК-связывающей частью и выбрана из группы, состоящей из



где R представляет собой уходящую группу;

R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 , R^4 , R^{12} и R^{19} независимо выбраны из H, OH, SH, NH_2 , N_3 , NO_2 , NO, CF_3 , CN, $C(O)NH_2$, $C(O)H$, $C(O)OH$, галогена, R^a , SR^a , $S(O)R^a$, $S(O)_2R^a$, $S(O)OR^a$, $S(O)_2OR^a$, $OS(O)R^a$, $OS(O)_2R^a$, $OS(O)OR^a$, $OS(O)_2OR^a$, OR^a , NHR^a , $N(R^a)R^b$, $+N(R^a)(R^b)R^c$, $P(O)(OR^a)(OR^b)$, $OP(O)(OR^a)(OR^b)$, $SiR^aR^bR^c$, $C(O)R^a$, $C(O)OR^a$, $C(O)N(R^a)R^b$, $OC(O)R^a$, $OC(O)OR^a$, $OC(O)N(R^a)R^b$, $N(R^a)C(O)R^b$, $N(R^a)C(O)OR^b$, и $N(R^a)C(O)N(R^b)R^c$, где R^a , R^b , и R^c независимо выбраны из H и необязательно замещенного C_{1-3} алкила или C_{1-3} гетероалкила, или $R^3 + R^3$ и/или $R^4 + R^4$ независимо выбраны из = O, = S, = NOR¹⁸, = C(R¹⁸)R¹⁸ и = NR¹⁸, R¹⁸ и R¹⁸ независимо выбран из H и необязательно замещенного C_{1-3} алкила, два или более из R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 , R^4 и R^{12} , необязательно соединяются одной или несколькими связями с образованием одного или более необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов;

X^2 выбран из O, $C(R^{14})(R^{14})$ и NR^{14} , где R^{14} и R^{14} имеют такое же значение, что и определенные для R^7 , и независимо выбраны, или R^{14} и R^7 отсутствуют, что приводит к двойной связи между атомами, предназначенными для того, чтобы нести R^7 и R^{14} ;

R^5 , R^5 , R^6 , R^6 , R^7 и R^7 независимо выбраны из H, OH, SH, NH_2 , N_3 , NO_2 , NO, CF_3 , CN, $C(O)NH_2$, $C(O)H$, $C(O)OH$, галогена, R^c , SR^c , $S(O)R^c$, $S(O)_2R^c$, $S(O)OR^c$, $S(O)_2OR^c$, $OS(O)R^c$, $OS(O)_2R^c$, $OS(O)OR^c$, $OS(O)_2OR^c$, OR^c , NHR^c , $N(R^c)R^f$, $+N(R^c)(R^f)R^g$, $P(O)(OR^c)(OR^f)$, $OP(O)(OR^c)(OR^f)$, $SiR^cR^fR^g$, $C(O)R^c$, $C(O)OR^c$, $C(O)N(R^c)R^f$, $OC(O)R^c$, $OC(O)OR^c$, $OC(O)N(R^c)R^f$, $N(R^c)C(O)R^f$, $N(R^c)C(O)OR^f$, $N(R^c)C(O)N(R^f)R^g$ и водорастворимой группы, где R^c , R^f и R^g независимо выбраны из H и необязательно замещенного $(CH_2CH_2O)_eCH_2CH_2X^{13}R^{e1}$, C_{1-15} алкила, C_{1-15} гетероалкила, C_{3-15} циклоалкила, C_{1-15} гетероциклоалкила, C_{5-15} арила или C_{1-15} гетероарила, где ее выбирают от 1 до 1000, X^{13} выбирают из O, S

и NR^{fl} , а R^{fl} и R^{el} являются независимо выбранными из H и C_{1-3} -алкила, один или нескольких необязательных заместителей в R^{e} , R^{f} и/или R^{g} необязательно являются водорастворимой группой, два или более из R^{e} , R^{f} и R^{g} , необязательно, соединяются одной или несколькими связями с образованием одного или нескольких необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов, или

$\text{R}^5 + \text{R}^{5'}$ и/или $\text{R}^6 + \text{R}^{6'}$ и/или $\text{R}^7 + \text{R}^{7'}$ независимо выбраны из $=\text{O}$, $=\text{S}$, $=\text{NOR}^{\text{e3}}$, $=\text{C}(\text{R}^{\text{e3}})\text{R}^{\text{e4}}$ и $=\text{NR}^{\text{e3}}$, R^{e3} и R^{e4} независимо выбраны из H и необязательно замещенного C_{1-3} алкила или $\text{R}^{5'} + \text{R}^{6'}$ и/или $\text{R}^{6'} + \text{R}^{7'}$ и/или $\text{R}^{7'} + \text{R}^{14'}$, что приводит к двойной связи между атомами, предназначенными для того, чтобы нести $\text{R}^{5'} + \text{R}^{6'}$ и/или $\text{R}^{6'} + \text{R}^{7'}$ и/или $\text{R}^{7'} + \text{R}^{14'}$ соответственно, два или более из R^5 , $\text{R}^{5'}$, R^6 , $\text{R}^{6'}$, R^7 , $\text{R}^{7'}$, R^{14} и $\text{R}^{14'}$ необязательно соединяются одной или несколькими связями с образованием одного или нескольких необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов;

X^1 выбран из O, S и NR, где R выбран из H и необязательно замещенного C_{1-8} -алкила или C_{1-8} -гетероалкила и не присоединен ни к какому другому заместителю;

X^3 выбран из O, S, $\text{C}(\text{R}^{15})\text{R}^{15'}$, $-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-\text{C}(\text{R}^{15''})(\text{R}^{15'''})-$, $-\text{N}(\text{R}^{15})-\text{N}(\text{R}^{15'})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-\text{N}(\text{R}^{15''})-$, $-\text{N}(\text{R}^{15''})-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{C}(\text{R}^{15})(\text{R}^{15'})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15})=\text{C}(\text{R}^{15'})-$, $=\text{C}(\text{R}^{15})-\text{C}(\text{R}^{15'})=$, $-\text{N}=\text{C}(\text{R}^{15'})-$, $=\text{N}-\text{C}(\text{R}^{15'})=$, $-\text{C}(\text{R}^{15'})=\text{N}-$, $=\text{C}(\text{R}^{15'})-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{N}=\text{N}-$, $=\text{N}-\text{N}=\text{N}-$, CR^{15} , N, NR^{15} , или DB1 и DB2-X3-представляет собой $-\text{X}^{3\text{a}}$ и $\text{X}^{3\text{b}}$, где $\text{X}^{3\text{a}}$ соединен с $\text{X}^{3\text{d}}$, между $\text{X}^{3\text{d}}$ и X^4 присутствует двойная связь, а $\text{X}^{3\text{b}}$ связана с X^{11} , где $\text{X}^{3\text{a}}$ независимо выбран из H и необязательно замещенных $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{e}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{13}\text{R}^{\text{e1}}$, C_{1-8} -алкила или C_{1-8} -гетероалкила и не присоединенный к какому-либо другому заместителю;

X^4 выбран из O, S, C (R^{16}) $\text{R}^{16'}$, NR^{16} , N и CR^{16} ;

X^5 выбран из O, S, C (R^{17}) $\text{R}^{17'}$, NOR^{17} и NR^{17} , где R^{17} и $\text{R}^{17'}$ независимо выбраны из H и необязательно замещенного C_{1-8} -алкила или C_{1-8} -гетероалкила и не присоединен к какому-либо другому заместителю;

X^6 выбран из CR^{11} , $\text{CR}^{11}(\text{R}^{11'})$, N, NR^{11} , O и S;

X^7 выбран из CR^8 , $\text{CR}^8(\text{R}^8)$, N, NR^8 , O и S;

X^8 выбран из CR^9 , $\text{CR}^9(\text{R}^9)$, N, NR^9 , O и S;

X^9 выбран из CR^{10} , $\text{CR}^{10}(\text{R}^{10'})$, N, NR^{10} , O и S;

X^{10} выбран из CR^{20} , $\text{CR}^{20}(\text{R}^{20'})$, N, NR^{20} , O и S;

X^{11} выбран из C, CR^{21} и N или $\text{X}^{11}-\text{X}^{3\text{b}}$ выбран из CR^{21} , $\text{CR}^{21}(\text{R}^{21'})$, N, NR^{21} , O и S;

X^{12} выбран из C, CR^{22} и N;

X^{6*} , X^{7*} , X^{8*} , X^{9*} , X^{10*} и X^{11*} имеют то же значение, что определенные для X^6 , X^7 ,

X^8 , X^9 , X^{10} и X^{11} , соответственно, и независимо выбираются;

X^{34} выбран из C, CR^{23} и N;

атом кольца B X^{11*} в DB6 и DB7 соединен с атомом кольца A так, что кольцо A и кольцо B в DB6 и DB7 непосредственно связаны одинарной связью;

пунктирная двойная связь означает, что указанная связь может представлять собой одинарную связь или некумулятивную, необязательно делокализованную двойную связь;

R^8 , $\text{R}^{8'}$, R^9 , $\text{R}^{9'}$, R^{10} , $\text{R}^{10'}$, R^{11} , $\text{R}^{11'}$, R^{15} , $\text{R}^{15'}$, $\text{R}^{15''}$, $\text{R}^{15'''}$, R^{16} , $\text{R}^{16'}$, R^{20} , $\text{R}^{20'}$, R^{21} , $\text{R}^{21'}$, R^{22} и R^{23} каждый независимо выбран из H, OH, SH, NH_2 , N_3 , NO_2 , NO, CF_3 , CN, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $\text{C}(\text{O})\text{H}$, $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, halogen, R^{h} , SR^{h} , $\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{h}}$, $\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{\text{h}}$, $\text{S}(\text{O})\text{OR}^{\text{h}}$, $\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^{\text{h}}$, $\text{OS}(\text{O})\text{R}^{\text{h}}$, $\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^{\text{h}}$, $\text{OS}(\text{O})\text{OR}^{\text{h}}$, $\text{OS}(\text{O})_2\text{OR}^{\text{h}}$, OR^{h} , NHR^{h} , $\text{N}(\text{R}^{\text{h}})\text{R}^{\text{i}}$, $^+\text{N}(\text{R}^{\text{h}})(\text{R}^{\text{i}})\text{R}^{\text{j}}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{\text{h}})(\text{OR}^{\text{i}})$, $\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^{\text{h}})(\text{OR}^{\text{i}})$, $\text{SiR}^{\text{h}}\text{R}^{\text{i}}\text{R}^{\text{j}}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{h}}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{h}}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{h}})\text{R}^{\text{i}}$, $\text{OC}(\text{O})\text{R}^{\text{h}}$, $\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{\text{h}}$, $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{h}})\text{R}^{\text{i}}$, $\text{N}(\text{R}^{\text{h}})\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{i}}$, $\text{N}(\text{R}^{\text{h}})\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{i}}$, $\text{N}(\text{R}^{\text{h}})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{i}})\text{R}^{\text{j}}$ и водорастворимой группы, где R^{h} , R^{i} и R^{j} независимо выбраны из H и необязательно замещенного $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{e}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{13}\text{R}^{\text{e1}}$, C_{1-15} -алкила, C_{1-15} -гетероалкила, C_{3-15} -циклоалкила, C_{1-15} -гетероциклоалкила, C_{5-15} -арила или C_{1-15} -гетероарила, один или несколько необязательных заместителей в R^{h} , R^{i} и/или R^{j} , необязательно являющихся водорастворимой группой, два или более R^{h} , R^{i} и R^{j} необязательно соединяются одной или несколькими связями с образованием одного или нескольких необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов, или

$\text{R}^8 + \text{R}^{8'}$ и/или $\text{R}^9 + \text{R}^{9'}$ и/или $\text{R}^{10} + \text{R}^{10'}$ и/или $\text{R}^{11} + \text{R}^{11'}$ и/или $\text{R}^{15} + \text{R}^{15'}$ и/или $\text{R}^{15''} + \text{R}^{15'''}$ и/или $\text{R}^{16} + \text{R}^{16'}$ и/или $\text{R}^{20} + \text{R}^{20'}$ и/или $\text{R}^{21} + \text{R}^{21'}$ независимо выбраны из $=\text{O}$, $=\text{S}$, $=\text{NOR}^{\text{h1}}$, $=\text{C}(\text{R}^{\text{h1}})\text{R}^{\text{h2}}$ и $=\text{NR}^{\text{h1}}$, R^{h1} и R^{h2} независимо выбраны из H и необязательно замещенного C_{1-3} -алкила, два или более R^8 , $\text{R}^{8'}$, R^9 , $\text{R}^{9'}$, R^{10} , $\text{R}^{10'}$, R^{11} , $\text{R}^{11'}$, R^{15} , $\text{R}^{15'}$, $\text{R}^{15''}$, $\text{R}^{15'''}$, R^{16} , $\text{R}^{16'}$, R^{20} , $\text{R}^{20'}$, R^{21} , $\text{R}^{21'}$, R^{22} и R^{23} необязательно соединены одной или несколькими связями с образованием одного или нескольких необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов;

$\text{R}^{8\text{b}}$ и $\text{R}^{9\text{b}}$ независимо выбраны и имеют такое же значение, что и R^8 , за исключением того, что они не могут быть соединены с каким-либо другим заместителем;

один из R^4 и $\text{R}^{4'}$ и один из R^{16} и $\text{R}^{16'}$ могут быть необязательно соединены одной или несколькими связями с образованием одного или нескольких необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов;

один из R^4 и $\text{R}^{4'}$ и один из R^{16} и $\text{R}^{16'}$ может быть необязательно присоединены к одному из R^2 , $\text{R}^{2'}$, R^3 и $\text{R}^{3'}$ и один из R^5 и $\text{R}^{5'}$ могут быть необязательно соединены одной или несколькими связями с образованием одного или нескольких необязательно замещенных карбоциклов и/или гетероциклов;

a и b независимо выбран из 0 и 1;

компонент DB не включает компонент DAI, DA2, DAI', или DA2';

кольцо В в DB1 является гетероциклом;
если X^3 в DB1 представляет собой $-X^{3a}$ и X^{3b} - и кольцо В является ароматическим, то два вицинальных заместителя на указанном кольце В соединяются с образованием необязательно замещенного карбоцикла или гетероцикла, слитого с указанным кольцом В;

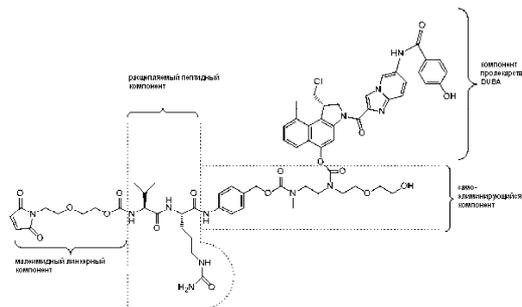
если X^3 в DB2 представляет собой $-X^{3a}$ и X^{3b} - а кольцо В является ароматическим, то два вицинальных заместителя на указанном кольце В соединяются с образованием необязательно замещенного гетероцикла, слитого с указанным кольцом В, необязательно замещенного неароматического карбоцикла, слитого с указанным кольцом В или замещенный ароматический карбоцикл, который слит с указанным кольцом В и к которому присоединен по меньшей мере один заместитель, который содержит гидроксигруппу, первичную аминогруппу или вторичную аминогруппу, причем первичный или вторичный амин не является кольцевым атомом в системе ароматических колец или не являющийся частью амида;

если кольцо А в DB2 представляет собой 6-членное ароматическое кольцо, то заместители на кольце В не соединяются с образованием кольца, слитого с кольцом В;

два вицинальных заместителя на кольце А в DB8 соединяются с образованием необязательно замещенного карбоцикла или гетероцикла, конденсированного с указанным кольцом А, с образованием бициклической группы, к которой не присоединены никакие дополнительные кольца; и кольцо А в DB9 вместе с любыми кольцами, конденсированными с указанным кольцом А, содержит по меньшей мере два кольцевых гетероатома.

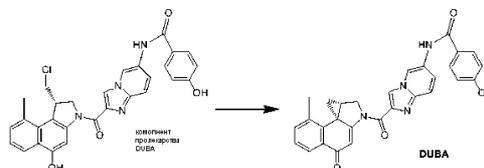
Вышеописанные линкерные молекулы могут быть конъюгированы с цистеиновой тиольной группой с применением тиол-малеимидной химии, как показано выше. В некоторых воплощениях цитотоксический лекарственный компонент дуокармицина представляет собой пролекарство. Например, пролекарство, *vc-seso-DUBA* может быть конъюгировано с самоэлиминирующимся компонентом, связанным с maleimидным линкером, с помощью расщепляемого пептидного компонента.

Схема 7



Компонент maleimидного линкера молекулы может быть конъюгирован с тиоловой группой остатка цистеина домена VL и/или домена VH и/или константного домена части Ab из B7-H3-ADC по изобретению. Последующее протеолитическое расщепление расщепляемого пептидного компонента сопровождается спонтанным элиминированием самоэлиминирующегося фрагмента, что приводит к высвобождению *seso-DUBA*, который спонтанно перестраивается с образованием активного лекарственного средства DUBA.

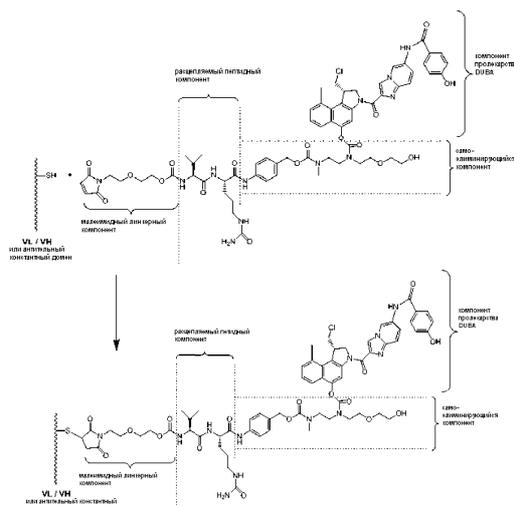
Схема 8



(см. Dokter, W. et al. (2014) "Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform", Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629).

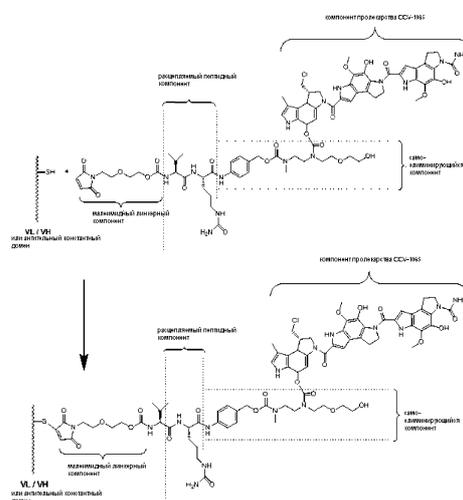
В предпочтительном способе получения конъюгатов B7-H3-дуокармициновый лекарственный компонент, может быть использован способ Elgersma, R.C. et al. (2014) "Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985", Mol. Pharmaceut. 12: 1813-1835 или документа WO 2011/133039. Таким образом, тиол-содержащая группа цепи VL или VH антитела или фрагмента антитела анти-B7-H3 конъюгированы с *seso-DUBA* или другим пролекарством через maleimидный линкерный компонент, расщепляемый пептидный компонент, самоэлиминирующийся компонент (схема 9A).

Схема 9А



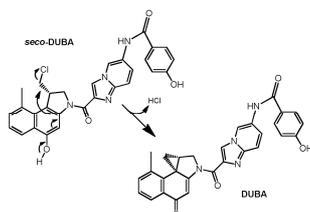
Хотя изобретение проиллюстрировано в отношении пролекарства DUBA, альтернативно могут быть использованы другие пролекарства, например CC-1065, как показано на схеме 9В.

Схема 9В



При расщеплении расщепляемого пептидного компонента и элиминации самоэлиминирующегося компонента, пролекарственный компонент подвергается спироциклизации Винштейна с получением активного лекарственного средства (например, DUBA из *seco*-DUBA, как показано на схеме 9С).

Схема 9С



seco-DUBA получают из соответствующих ДНК-алкилирующих и ДНК-связывающих компонентов (например, каркаса 1,2,9,9а-тетрагидроциклопропил[с]бензо[e]индол-4-она, как описано Elgersma, R.C. et al. (2014) "Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985", Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835 (см., Boger, D.L. et al. (1989) "Total Synthesis and Evaluation of (±)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-CBI, (±)-CBI-CDP11, and (±)-CBI-CDP12: CC-1065 Functional Agents Incorporating the Equivalent 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]benz[1,2-e]indol-4-one (CBI) Left-Hand Subunit" J. Am. Chem. Soc. 111:6461-6463; Boger, D.L. et al. (1992) "DNA Alkylation Properties of Enhanced Functional Analogs of CC-1065 Incorporating the 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]benz[1,2-e]indol-4-one (CBI) Alkylation Subunit", J. Am. Chem. Soc. 114:5487-5496).

Схема 9D иллюстрирует изобретение, демонстрируя синтез ДНК-алкилирующего фрагмента для DUBA. Так, о-толуальдегид (1) и диметилсукцинат (2) подвергают взаимодействию с получением смеси кислот (3a/3b) через конденсацию Штоббе. Кольцевое замыкание смеси кислот может быть выполнено трифторуксусным ангидридом с получением спирта (4), который затем защищается бензилхлоридом с получением бензилового эфира (5). Последующий гидролиз группы метилового эфира дает карбоновую

кислоту (6), за которой следует перегруппировка Курциуса в смеси толуола и трет-бутилового спирта с получением карбамата (7). Бромирование с помощью N-бромсукцинимид дает бромид (8). Бромид (8) алкилируют (S)-глицидил-нозилатом в присутствии трет-бутоксид калия с получением эпоксида (9). Реакция с н-бутиллитием дает смесь искомого соединения (10) и дебромированного перестроенного производного (11). Выход целевого соединения (10) выше, когда в качестве растворителя используют тетрагидрофуран и температуру реакции поддерживают между -25 и -20°C. В этих условиях искомое соединение (10) и дебромированное, перегруппированное производное (11) получают в приблизительном соотношении 1:1. Обработка п-толуолсульфоновой кислотой приводит к превращению дебромированного, перегруппированного производного (11) в (7), тем самым способствуя восстановлению искомого соединения (10). Мезилирование гидроксильной группы в (10) с последующим замещением хлоридом с применением хлорида лития дает ключевое промежуточное соединение (12).

Схема 9D

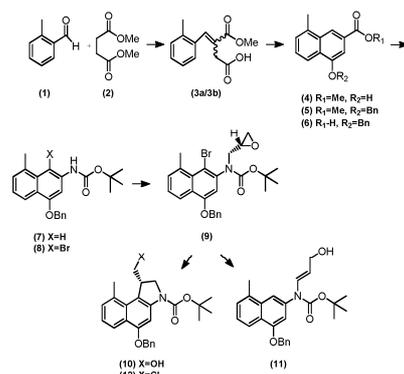
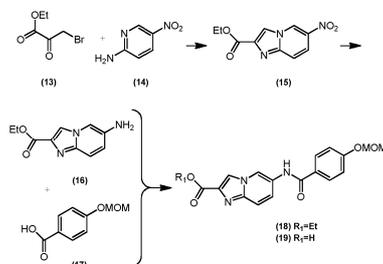


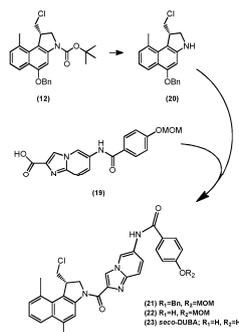
Схема 9E иллюстрирует изобретение, демонстрируя синтез ДНК-связывающего фрагмента для DUBA. Так, реакции циклизации по Чичибабину разрешается протекать между этилбромидом (13) и 5-нитропиридин-2-амином (14), с получением при этом нитросоединения (15). Восстановление нитрогруппы цинком в кислых условиях дает амин (16). Соединение с метилоксиметил (MOM) -защитенной 4-гидроксibenзойной кислотой (17), полученной из метил-4-гидроксibenзоата путем реакции с хлорметилметилловым эфиром с последующим гидролизом сложного эфира (см. WO 2004/080979) дает этиловый эфир (18), который может гидролизоваться гидроксидом натрия в водном 1,4-диоксане с получением кислоты (19).

Схема 9E



seco-DUBA затем синтезируется из ДНК-алкилирующей единицы (12) и ДНК-связывающего фрагмента (19). Трет-бутоксикарбонильную (Boc) защитную группу удаляют из (12) в кислых условиях с образованием амина (20). EDC-опосредованное соединение амина (20) и соединения (19) дает защищенное соединение (21), с которого затем полностью снимается защита в двух последовательных стадиях (с Pd/C, NH₄HCO₂, MeOH/THF, 3 ч, 90%, с получением (22), а затем с помощью HCl, 1,4-диоксан/вода, 1 ч, 95%, чтобы обеспечить seco-DUBA (23) в виде его HCl-соли (схема 9F).

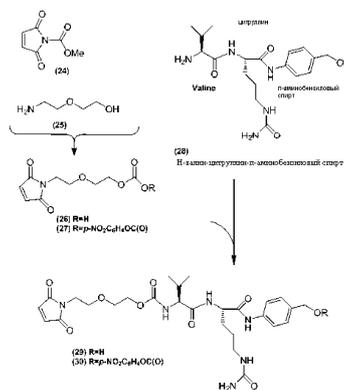
Схема 9F



Пролекарства других лекарственных средств, например CC-1065, могут быть синтезированы, как описано, например, в WO 2010/062171.

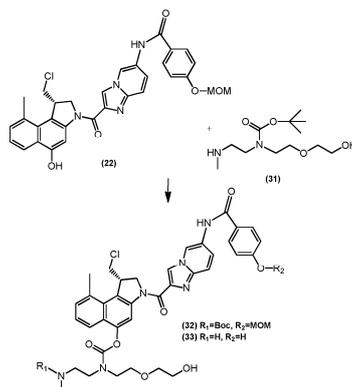
Пролечкарственное соединение предпочтительно связывается с другими фрагментами ADC в соответствии со схемой 9G. Структурный блок малеимидного линкера синтезировали, начиная с реакции конденсации между (24) и 2-(2-аминоэтокси) этанолом (25) с получением спирта (26), который затем превращали в реакционноспособный карбонат (27) путем реакции с 4-нитрофенилхлорформиадом. Соединение (27) с Н-валин-цитруллин-РАВА (28), полученное согласно Dubowchik, G.M. et al. (2002) "Cathepsin B-Labile Diptide Linkers For Lysosomal Release Of Doxorubicin From Internalizing Immunoconjugates: Model Studies Of Enzymatic Drug Release And Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity", *Bioconjugate Chem.* 13:855-869) приводит к образованию линкера (29), который обрабатывают бис (4-нитрофенил) карбонатом с получением активированного линкера (30).

Схема 9G



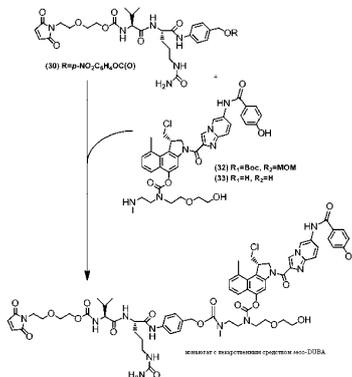
Как показано на схеме 9H, *seco*-DUBA-MOM (22) модифицируют для конъюгации в две стадии. Последовательная обработка (22) 4-нитрофенилхлорформиадом и трет-бутилметил (2-(метиламино)этил)карбаматом (31) дает соединение (32). Удаление защитных групп Boc и MOM в (32) с помощью трифторуксусной кислоты (TFA) обеспечивало (33) в виде его соли TFA.

Схема 9H



ADC был синтезирован реакцией активированного линкера (30) с конструкцией циклизационный спейсер-дуокармицин (33) в слабо основных условиях. В этих условиях самоэлиминация циклизационного спейсера и образование 3a было подавлено (схема 9I).

Схема 9I



Процесс генерирует в среднем две свободные тиоловые группы на mAb, что приводит к статистическому распределению V7-H3-ADC со средним соотношением лекарственного средства к антителу (DAR) около двух и низкими количествами высокомолекулярных частиц и остаточным неконъюгированным дуокармициновым компонентом.

Порядок стадий синтеза может изменяться по желанию. Предпочтительно, используемый способ

будет тем, что на схемах 9А-9І, как описано выше.

ХІІ. Применения В7-Н3-связывающих молекул настоящего изобретения.

Настоящее изобретение охватывает композиции, в том числе фармацевтические композиции, содержащие В7-Н3-связывающей молекулы по настоящему изобретению (например, антитела, биспецифические антитела, биспецифические диатела, трехвалентные связывающие молекулы, В7-Н3-ADC и т.д.), полипептиды, полученные из таких молекул, полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие такие молекулы или полипептиды, и другие агенты, как описано в данном документе.

В соответствии с данным документом, В7-Н3-связывающие молекулы по настоящему изобретению, включающие анти-В7-Н3-VL и/или VH-домены, предлагаемые в данном документе, обладают способностью связывать В7-Н3, присутствующий на поверхности клетки, и индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементарно-зависимую цитотоксичность (CDC) и/или опосредовать перенацеленное уничтожение клеток (например, перенацеленную цитотоксичность Т-клеток). Без указания какого-либо механизма действия, молекулы В7-Н3-ADC по настоящему изобретению интернализируются при связывании с В7-Н3, экспрессируемом опухолевой клеткой, и опосредуют уничтожение опухолевой клетки посредством действия конъюгированного цитотоксина.

Таким образом, В7-Н3-связывающие молекулы по настоящему изобретению, включающие анти-В7-Н3-VL и/или VH-домены, обладают способностью лечить любое заболевание или состояние, связанное с В7-Н3 или характеризующее экспрессией В7-Н3. Как обсуждалось выше, В7-Н3 является онкоэмбриональным антигеном, экспрессируемым в многочисленных злокачественных новообразованиях системы кроветворения и солидных опухолях, который ассоциирован с опухолями высокой степени злокачественности, демонстрирующими менее дифференцированную морфологию, и коррелирует с плохими клиническими результатами. Таким образом, без ограничения указанным, В7-Н3-связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть использованы для диагностики или лечения раков, в частности раков, характеризующихся экспрессией В7-Н3.

Рак, на который можно воздействовать В7-Н3-связывающими молекулами по настоящему изобретению, включает рак, характеризующийся наличием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки опухоли надпочечников, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, В-клеточной неоплазии, рака молочной железы, опухоли сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, язвенной карциномы клетки, рака ободочной кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, опухоли зародышевых клеток, рака головы и шеи, глиобластомы, гемобластозов, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза (например, острого миелоидного лейкоза), липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC)), медуллобластомы, меланомы, менингиомы, мезотелиомы фарингеального рака, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли паращитовидной железы, детского онкологического заболевания, опухоли периферических нервных оболочек, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, увеальной меланомы заднего полюса, почечного метастатического рака, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, рака кожи, сине-мелкокруглоклеточных опухолей детей (включая нейробластомы и рабдомиосаркомы), саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN)), рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

В частности, В7-Н3-связывающей молекулы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, глиобластомы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Беркетта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы из клеток маргинальной зоны, мезотелиомы фарингеального рака, неходжкинской лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, множественной миеломы, меланомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи, карциномы почек, сине-мелкокруглоклеточных опухолей детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN)), рака яичек, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

Биспецифические В7-Н3-связывающие молекулы по настоящему изобретению дополняют терапию рака, обеспечиваемую В7-Н3, путем содействия перенацеленному уничтожению опухолевых клеток,

которые экспрессируют вторую специфичность таких молекул (например, CD2, CD3, CD8, CD16, T-клеточный рецептор (TCR), NKG2D и т.д.). Такие В7-Н3-связывающие молекулы, особенно полезны при лечении рака.

В дополнение к их полезности в терапии, В7-Н3-связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть детектируемо маркированы и использованы для диагностики рака или при визуализации опухолей и опухолевых клеток.

XIII. Фармацевтические композиции.

Композиции по изобретению включают нерасфасованные лекарственные композиции, пригодные для изготовления фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е. композиции, которые подходят для введения объекту или пациенту), которые могут быть использованы в подготовке стандартных лекарственных форм. Такие композиции включают профилактически или терапевтически эффективное количество В7-Н3-связывающих молекул по настоящему изобретению или комбинацию таких агентов и фармацевтически приемлемого носителя. Предпочтительно композиции по изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество В7-Н3-связывающих молекул по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение также охватывает такие фармацевтические композиции, которые дополнительно включают второе терапевтическое антитело (например, опухолеспецифичное моноклональное антитело), которое является специфичным для конкретного ракового антигена, и фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном воплощении термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения на животных, и, более конкретно, на людях. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному), эксципиенту или носителю, с которым вводится терапевтическое средство. Как правило, ингредиенты композиций по изобретению поставляются либо отдельно, либо смешиваются вместе в стандартной дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или концентрата без воды в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, указывающей количество активного агента. Там, где композиция должна вводиться путем инфузии, ее можно распределять из инфузионной бутылки, содержащей стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической категории. Когда композицию вводят путем инъекции, может быть предусмотрена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, так что ингредиенты могут быть смешаны до введения.

Изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или несколько контейнеров, наполненных В7-Н3-связывающей молекулой по настоящему изобретению, отдельно или с таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, один или несколько других профилактических или терапевтических агентов, полезных для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтический пакет или набор. Изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций по изобретению. Необязательно связанным с таким контейнером(ами) может быть уведомление в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, которое отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения людям.

Настоящее изобретение предлагает наборы, которые могут использоваться в вышеуказанных способах. Набор может содержать любую из В7-Н3-связывающих молекул по настоящему изобретению, включая В7-Н3-ADC. Набор может дополнительно содержать один или несколько других профилактических и/или терапевтических агентов, полезных для лечения рака, в одном или нескольких контейнерах.

XIV. Способы введения.

Композиции по настоящему изобретению могут быть предусмотрены для лечения, профилактики и улучшения одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или инфекцией, путем введения объекту эффективного количества гибридного белка или конъюгированной молекулы по изобретению, или фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок или конъюгированную молекулу по изобретению. В предпочтительном аспекте такие композиции по существу очищаются (т.е. практически не содержат веществ, которые ограничивают его действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). В конкретном воплощении объектом является животное, предпочтительно млекопитающее, такое как не примат (например, бык, лошадь, кошка, собачий, грызун и т.д.) или примат (например, обезьяна, такая как яванский макак, человек и т.д.). В предпочтительном воплощении объект является человеком.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения композиций по изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантных клетках, способных экспрессировать антитело или гибридный белок, опосредуемый рецептором эндцитоз (см., например, Wu et al., (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble

DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения молекулы по изобретению включают, без ограничения указанным, парентеральное введение (например, внутривенные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные и подкожные), эпидуральные и слизистые (например, интраназальные и пероральные пути). В конкретном воплощении В7-НЗ-связывающие молекулы по настоящему изобретению, вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и слизистую оболочку кишечника и т.д.) и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Может быть использовано введение через легкие, например, с помощью ингалятора или распылителя и состава с распыляемым агентом; см., например, пат. США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; и 4880078; и публ. РСТ № WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящее описание ссылкой во всей полноте.

Изобретение также предусматривает, что препараты В7-НЗ-связывающих молекул по настоящему изобретению, упаковывают в герметически закрытый контейнер, такой как ампула или саше, указывающие количество молекулы. В одном воплощении такие молекулы поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или концентрата без воды в герметично закрытом контейнере и могут быть восстановлены, например, водой или физиологическим раствором до соответствующей концентрации для введения объекту. Предпочтительно В7-НЗ-связывающие молекулы по настоящему изобретению, поставляются в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере.

Лиофилизированные препараты В7-НЗ-связывающих молекул по настоящему изобретению следует хранить при температуре от 2 до 8°C в исходном контейнере, а молекулы следует вводить в течение 12 ч, предпочтительно в течение 6 ч, в течение 5 ч, в течение 3 ч или в течение 1 ч после восстановления. В альтернативном воплощении такие молекулы поставляются в жидкой форме в герметично закрытом контейнере, указывающем количество и концентрацию молекулы, гибридного белка или конъюгированной молекулы. Предпочтительно такие В7-НЗ-связывающие молекулы, если они представлены в жидкой форме, поставляются в герметично закрытом контейнере.

Количество таких препаратов по изобретению, которые будут эффективны при лечении, профилактике или улучшении одного или нескольких симптомов, связанных с расстройством, могут быть определены стандартными клиническими методами. Точная доза, которая будет использоваться в препарате, будет также зависеть от способа введения и от тяжести состояния и должна определяться в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из *in vitro* тест-систем или тест-систем на животных.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для получения полезных или искомых результатов, включая, без ограничения указанным, клинические результаты, такие как уменьшение симптомов, возникающих в результате заболевания, ослабление симптома инфекции (например, вирусной нагрузки, лихорадки, боли, сепсиса и т.д.) или симптома рака (например, пролиферации, раковых клеток, наличия опухолей, метастазов опухолей и т.д.), тем самым повышая качество жизни страдающих от болезни, уменьшая дозу других лекарств, необходимых для лечения болезни, усиливая эффект другого лекарственного средства, например, путем нацеливания и/или интернализации, тем самым задерживая прогрессирование заболевания и/или пролонгирования выживания индивидуумов.

Эффективное количество можно вводить в одном или нескольких введениях. Для целей настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для снижения пролиферации (или эффекта) вирусного присутствия, а также для уменьшения и/или замедления развития вирусного заболевания, либо непосредственно, либо косвенно. В некоторых воплощениях эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнуто или не достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" может быть рассмотрено в контексте введения одного или нескольких химиотерапевтических агентов, и один агент может считаться указанным в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами искомый результат может быть достигнут или был достигнут. В то время как индивидуальные потребности варьируют, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого компонента входит в компетенцию специалистов.

Для В7-НЗ-связывающих молекул, охватываемых изобретением, дозировка, вводимая пациенту, предпочтительно определяется на основе массы тела (кг) объекта-реципиента. Для В7-НЗ-связывающих молекул, охватываемых изобретением, дозировка, вводимая пациенту, обычно составляет от около 0,01 мг/кг до около 30 мг/кг или более от массы тела объекта.

Дозировка и частота введения В7-НЗ-связывающей молекулы по настоящему изобретению могут

быть уменьшены или изменены из-за усиления поглощения и проникновения в ткани молекулы посредством модификаций, таких как, например, липидация.

Дозировка молекулы В7-НЗ-связывающей молекулы по изобретению, вводимой пациенту, может быть рассчитана для использования в качестве монотерапии. В ином случае, молекула может использоваться в комбинации с другими терапевтическими композициями, а дозировка, вводимая пациенту, ниже, чем когда указанные молекулы используются как монотерапия.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить локально в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, без ограничения указанным, местной инфузией путем инъекции или с помощью имплантата, причем указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желатинообразный материал, включая мембраны, такие как мембраны sialastic, или волокна. Предпочтительно, при введении молекулы по изобретению следует проявлять осторожность при использовании материалов, которые могут абсорбировать молекулу.

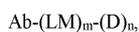
Композиции по изобретению могут быть доставлены в везикуле, в частности липосоме (See Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327).

Обработка объекта терапевтически или профилактически эффективным количеством В7-НЗ-связывающей молекулы по настоящему изобретению может включать однократную обработку или, предпочтительно, может включать серию обработок. В предпочтительном примере объект обрабатывают таким диателом один раз в неделю в течение от 1 до 10 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от 3 до 7 недель и еще более предпочтительно около 4,5, или 6 недель. Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить один раз в день с таким введением один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, один раз в месяц, раз в шесть недель, один раз в два месяца, два раза в год или один раз в год и т.д. В ином случае, фармацевтические композиции по изобретению можно вводить два раза в день, причем такое введение происходит один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, один раз в месяц, раз в шесть недель, один раз в два месяца, два раза в год или один раз в год и т.д. В ином случае, фармацевтические композиции по изобретению можно вводить три раза в день при таком введении один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, один раз в месяц, раз в шесть недель, один раз в два месяца, два раза в год или раз в год и т.д. Также будет понятно, что эффективная доза молекул, используемых для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в течение конкретной обработки.

XV. Воплощения изобретения.

Изобретение, в частности, относится к следующим воплощениям (E_A и E_B).

E_A1. Конъюгат анти-В7-НЗ антитела и лекарственного средства (В7-НЗ-ADC), который включает формулу



где Ab представляет собой антитело, которое связывается с В7-НЗ, которое включает гуманизованный переменный домен тяжелой цепи (VH) и гуманизированный переменный домен легкой цепи (VL) или является его В7-НЗ-связывающим фрагментом;

D представляет собой цитотоксический лекарственный компонент;

LM представляет собой связь или линкерную молекулу, которая ковалентно связывает Ab и D;

m представляет собой целое число от 0 до n и обозначает количество линкерных молекул в В7-НЗ-ADC;

n представляет собой целое число от 1 до 10 и обозначает количество цитотоксических лекарственных компонентов, ковалентно связанных с молекулой В7-НЗ-ADC.

E_A2. В7-НЗ-ADC из E_A1, в котором:

(A) (i) указанный гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99 и

(ii) указанный гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104; или

(B) (i) указанный гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и

(ii) указанный гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21; или

(C) (i) указанный гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30 и

(ii) указанный гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

E_A3. В7-НЗ-ADC по E_A1, в котором указанный гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и указанный гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104.

E_A4. В7-НЗ-ADC по E_A1, в котором указанный гуманизированный домен VL включает аминокис-

лотную последовательность SEQ ID NO:20, и указанный гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

E_A5. B7-H3-ADC по E_A1, в котором указанный гуманизированный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и указанный гуманизированный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

E_A6. B7-H3-ADC по любому из E_A1-E_A5, в котором Ab представляет собой антитело.

E_A7. B7-H3-ADC по любому из E_A1-E_A5, в котором Ab представляет собой антиген-связывающий фрагмент антитела.

E_A8. B7-H3-ADC по любому из E_A1-E_A7, в котором B7-H3-ADC содержит домен Fc IgG человека.

E_A9. B7-H3-ADC по E_A8, в котором IgG человека представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

E_A10. B7-H3-ADC по E_A8 или E_A9, в котором домен Fc представляет собой вариантный домен Fc, который включает:

(a) одну или несколько аминокислотных модификаций, которые уменьшают аффинность вариант-ного домена Fc к FcγR; и/или

(b) одну или несколько аминокислотных модификаций, которые увеличивают период полувыведе-ния в сыворотке вариантного домена Fc.

E_A11. B7-H3-ADC по E_A10, в котором модификации, которые уменьшают аффинность вариант-ного домена Fc к FcγR, включают замену L234A; L235A; или L234A и L235A, где указанная нумерация соот-ветствует индексу EU, как у Kabat.

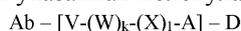
E_A12. B7-H3-ADC по E_A10 или E_A11, в котором модификации, которые увеличивают время полувыве-дения в сыворотке вариантного домена Fc, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, где указанная нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat.

E_A13. B7-H3-ADC по любому из E_A1-E_A12, в котором по меньшей мере один из указанных LM представляет собой линкерную молекулу.

E_A14. B7-H3-ADC по E_A13, в котором линкерная молекула LM представляет собой пептидный лин-кер.

E_A15. B7-H3-ADC по E_A13, в котором линкерная молекула LM является расщепляемым линкером.

E_A16. B7-H3-ADC по E_A15, в котором указанная молекула включает формулу



где V является указанной расщепляемой линкерной молекулой LM,

(W)_k-(X)_l-A представляет собой удлиненную самоэлиминирующуюся спейсерную систему, которая самоэлиминируется посредством a l₁(4+2n)-элиминации;

W и X каждый представляют собой спейсер каскада электронов a l₁(4+2n), являющихся одинаковы-ми или различными;

A представляет собой либо спейсерную группу формулы (Y)_m, где Y представляет собой спейсер каскада электронов a l₁(4+2n), либо группу формулы U, являющуюся спейсером циклизации-элиминации;

k, l и m независимо представляют собой целое число от 0 (включительно) до 5 (включительно);

n представляет собой целое число от 0 (включительно) до 10 (включительно);

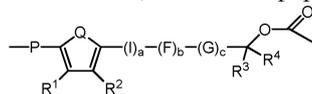
при условии, что

когда A равно (Y)_m: тогда k + l + m ≥ 1, и

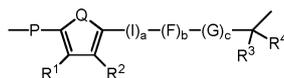
если k + l + m = 1, то n > 1;

когда A равно U: тогда k + l ≥ 1.

W, X и Y независимо выбраны из соединений, имеющих формулу



или формулу

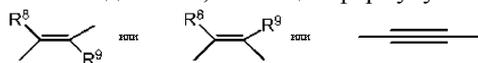


где Q представляет собой -R⁵C=CR⁶-, S, O, NR⁵, -R⁵C=N- или -N=CR⁵-;

P представляет собой NR⁷, O или S;

a, b и c независимо представляют собой целое число от 0 (включительно) до 5 (включительно);

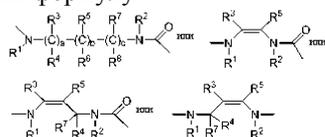
I, F и G независимо выбраны из соединений, имеющих формулу



где R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ независимо представляют собой H, C₁₋₆алкил, C₃₋₂₀гетероцикл, C₅₋₂₀арил, C₁₋₆алкокси, гидроксид (OH), амино (NH₂), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино (NR_x¹R_x²), нитро (NO₂), галоген, CF₃, CN, CONH₂, SO₂Me, CONHMe, циклический C₁₋₅алкиламино,

имидазолил, С₁₋₆алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси (COOH), карбоксилат (COOR_x), сульфокси (S(=O)₂OH), сульфонат (S(=O)₂OR_x), сульфонил (S(=O)₂R_x), сульфоксид (S(=O)OH), сульфинат (S(=O)OR_x), сульфинил (S(=O)R_x), фосфонокси (OP(=O)(OH)₂) и фосфат (OP(=O)(OR_x)₂), R_x¹ и R_x² независимо выбраны из С₁₋₆алкильной группы, С₃₋₂₀гетероциклической группы или С₅₋₂₀арильной группы, два или более заместителей R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ или R⁹ необязательно связаны друг с другом с образованием одной или нескольких алифатических или ароматических циклических структур;

U выбран из соединений, имеющих формулу



где a, b и c независимо выбраны как целое число 0 или 1; при условии, что a + b + c = 2 или 3;

R¹ и/или R² независимо представляют собой H, С₁₋₆алкил, причем указанный алкил необязательно замещен одной или несколькими из следующих групп: гидроксид (OH), простой эфир (OR_x), амино (NH₂), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино (NR_x¹R_x²), нитро (NO₂), галоген, CF₃, CN, CONH₂, SO₂Me, CONHMe, циклический С₁₋₅ алкиламино, имидазолил, С₁₋₆алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси (COOH), карбоксилат (COOR_x), сульфокси (S(=O)₂OH), сульфонат (S(=O)₂OR_x), сульфонил (S(=O)₂R_x), сульфоксид (S(=O)OH), сульфинат (S(=O)OR_x), сульфинил (S(=O)R_x), фосфонокси (OP(=O)(OH)₂) и фосфат (OP(=O)(OR_x)₂), где R_x, R_x¹ и R_x² выбраны из С₁₋₆алкильной группы, С₃₋₂₀гетероциклической группы или С₅₋₂₀арильной группы; и

R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ и R⁸ независимо представляют собой H, С₁₋₆алкил, С₃₋₂₀гетероциклической, С₅₋₂₀арил, С₁₋₆алкокси, гидроксид (OH), амино (NH₂), монозамещенный амино (NR_xH), дизамещенный амино (NR_x¹R_x²), нитро (NO₂), галоген, CF₃, CN, CONH₂, SO₂Me, CONHMe, циклический С₁₋₅алкиламино, имидазолил, С₁₋₆алкилпиперазинил, морфолино, тиол (SH), тиоэфир (SR_x), тетразол, карбокси (COOH), карбоксилат (COOR_x), сульфокси (S(=O)₂OH), сульфонат (S(=O)₂OR_x), сульфонил (S(=O)₂R_x), сульфоксид (S(=O)OH), сульфинат (S(=O)OR_x), сульфинил (S(=O)R_x), фосфонокси (OP(=O)(OH)₂) и фосфата (OP(=O)(OR_x)₂), где R_x, R_x¹ и R_x² выбраны из С₁₋₆алкильной группы, С₃₋₂₀гетероциклической группы или С₅₋₂₀арильной группы и два или более заместителей R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, или R⁸ необязательно связаны друг с другом с образованием одной или нескольких алифатических или ароматических циклических структур.

E_A17. В7-Н3-ADC по E_A16, в котором линкерная молекула LM включает:

- (1) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (2) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (3) п-аммоциннамиллоксикарбонил;
- (4) п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил;
- (5) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил;
- (6) п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил;
- (7) п-аминофенилпентаденилоксикарбонил;
- (8) п-аминофенилпентаденилоксикарбонил-п-арниоциннамиллоксикарбонил;
- (9) п-аминофенилпентаденилоксикарбонилп-аминобензилоксикарбонил;
- (10) п-аминофенилпентаденилоксикарбонил-п-аминофенилпентаденилоксикарбонил;
- (11) п-аминобензилоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (12) п-аминоциннамиллоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (13) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (14) п-аминоиндинамикоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (15) п-аминобензилоксикарбонил-п-арниоциннамиллоксикарбонил (метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (16) п-аминоциннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамиллоксикарбонил(метиламино)этил(метиламино)карбонил;
- (17) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензил;
- (18) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензилоксикарбонил-п-аминобензил;
- (19) п-аминоциннамил;
- (20) п-аминоциннанилоксикарбонил-п-аминобензил;
- (21) п-аминобензилоксикарбонил-п-аминоциннамил;
- (22) п-амино-циннамиллоксикарбонил-п-аминоциннамил;
- (23) п-аминофенилпентаденил;
- (24) п-аминофенилпентаденилоксикарбонил-п-аминоциннамил;
- (25) п-аминофенилпентаденилоксикарбонил-п-аминобензил или

(26) п-аминофенилпентадиенилоксикарбонил-п-аминофенилпентадиенил.

Е_A18. В7-Н3-ADC по любому из Е_A13-Е_A17, в котором указанном линкерная молекула LM конъюгирована с боковой цепью аминокислоты в полипептидной цепи Ab и связывает указанное Ab с молекулой указанного цитотоксического лекарственного компонента D.

Е_A19. В7-Н3-ADC по любому из Е_A1-Е_A18, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин, радиоизотоп, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормонов, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, миРНК РНКи, микроРНК, фотоактивный терапевтический агент, антиангиогенный агент, проапоптотический агент, пептид, липид, углевод, хелатирующий агент или их комбинации.

Е_A20. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин и выбран из группы, состоящая из тубулизина, ауристатиона, мейтанзиноида, калихеамицина, пирролобензодиазепина и дуокармицина.

Е_A21. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин тубулизин и выбран из группы, состоящей из тубулизина А, тубулизина В, тубулизина С, и тубулизина D.

Е_A22. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает ауристин цитотоксин и выбран из группы, состоящей из ММАЕ (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-норэфедрина) и ММАF (N-метилвалина-валин-долаизолеуин-долапроин-фенилаланина).

Е_A23. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает майтанзиноид цитотоксин и выбран из группы, состоящей из майтанзина, DM1 и DM4.

Е_A24. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин калихеамицин и выбран из группы, состоящей из калихеамицина Г1, калихеамицина β1Br, калихеамицина γ1Br, калихеамицина α2I, калихеамицина α3I, калихеамицина β1I, калихеамицина γ1I, и калихеамицина Δ1I.

Е_A25. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин пирролобензодиазепин и выбран из группы, состоящей из вадастуксимаба талирина, SJG-136, SG2000, SG2285 и SG2274.

Е_A26. В7-Н3-ADC по Е_A19, в котором указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает цитотоксин дуокармицин и выбран из группы, состоящей из дуокармицина А, дуокармицина В1, дуокармицина В2, дуокармицина С1, дуокармицина С2, дуокармицина D, дуокармицина SA, CC-1065, адозелезина, бизелезина, карзелезина (U-80244) и спиро-дуокармицина (DUBA).

Е_A27. В7-Н3-ADC по любому из Е_A1-Е_A26, в котором линкерная молекула LM ковалентно связана с указанным Ab с помощью восстановленных межцепочечных дисульфидов.

Е_A28. Фармацевтическая композиция, которая включает эффективное количество В7-Н3-ADC по любому из Е_A1-Е_A27 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Е_A29. Применение В7-Н3-ADC по любому из Е_A1-Е_A27 или фармацевтической композиции Е_A28 при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией В7-Н3 или характеризующегося экспрессией В7-Н3.

Е_A30. Применение Е_A29, в котором указанное заболевание или состояние, связанное с или характеризующееся экспрессией В7-Н3, представляет собой рака.

Е_A31. Применение Е_A30, где указанный рак характеризуется наличием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки опухоли надпочечников, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, В-клеточной неоплазии, рака молочной железы, опухоли сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, язвенной карциномы клетки, рака ободочной кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокругло-клеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, опухоли зародышевых клеток, рака головы и шеи, глиобластомы, гемобластозов, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза (например, острого миелоидного лейкоза), липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC)), медуллобластомы, меланомы, менингиомы, мезотелиомы фарингеального рака, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли паращитовидной железы, детского онкологического заболевания, опухоли периферических нервных оболочек, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, увеальной меланомы заднего полюса, почечного метастатического рака, рабдоидной опухоли, рабдомизаркомы, саркомы, рака кожи, сине-мелкокругло-клеточных опухолей де-

тей (включая нейробластомы и рабдомиосаркомы), саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN)), рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

Е_А31. Применение Е_А30, в котором указаный рак выбран из группы, включающей рак надпочечников, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, глиобластома, рак почки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Беркетта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы из клеток маргинальной зоны, мезотелиомы фарингеального рака, неходжкинской лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, множественной миеломы, меланомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи, карциномы почек, сине-мелкоклеточных опухолей детей (включая нейробластома и рабдомиосаркому), плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN)), рака яичек, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

Е_В1. В7-Н3-связывающая молекула, которая включает вариабельный домен легкой цепи (VL), который включает домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который включает домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}, где:

- (1) указанный домен CDR_{H1} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (2) указанный домен CDR_{H2} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28 и
- (3) указанный домен CDR_{H3} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

Е_В2. В7-Н3-связывающая молекула Е_В1, которая включает указанный домен VL, который включает домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} и указанный домен VH, который включает домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}, где:

- (1) указанный домен CDR_{L1} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23;
- (2) указанный домен CDR_{L2} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 и
- (3) указанный домен CDR_{L3} включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

Е_В3. В7-Н3-связывающая молекула Е_В1, которая включает указанный домен VL, который включает домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} и указанный домен VH, который включает домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3}, причем указанные домены выбраны из группы, состоящей из:

- (1) домен CDR_{H1}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (2) домен CDR_{H2}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;
- (3) домен CDR_{H3}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29;
- (4) домен CDR_{L1}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23;
- (5) домен CDR_{L2}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 и
- (6) домен CDR_{L3}, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

Е_В4. В7-Н3-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В3, где указанный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:31.

Е_В5. В7-Н3-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В4, где указанный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:30.

Е_В6. В7-Н3-связывающая молекула, которая включает домен VL и домен VH, где указанный домен VL включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

Е_В7. В7-Н3-связывающая молекула, которая включает домен VL и домен VH, где указанный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

Е_В8. В7-Н3-связывающая молекула, которая включает домен VL и домен VH, где указанный домен VL содержит аминокислоту SEQ ID NO:20 и указанный домен VH включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

Е_В9. В7-Н3-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В8, где указанная молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Е_В10. В7-Н3-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В8, где указанная молекула представляет собой:

- (a) биспецифическое антитело; или
- (b) диатело, причем указанный диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит две, три, четыре или пять полипептидных цепей; или
- (c) трехвалентную связывающую молекулу, причем трехвалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре, пять или более полипептидных цепей.

Е_В11. В7-Н3-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В10, где указанная молекула включает домен Fc.

Е_В12. В7-Н3-связывающая молекула Е_В10, где указанная молекула является диателом и включает домен, связывающий альбумин (ABD).

Е_В13. В7-Н3-связывающая молекула Е_В11, где указанный домен Fc является вариантным доменом

Fc, который включает:

- (a) одну или несколько аминокислотных модификаций, которые уменьшают аффинность вариантного домена Fc для FcγR; и/или
- (b) одну или несколько аминокислотных модификаций, которые увеличивают период полувыведения в сыворотке вариантного домена Fc.

Е_В14. В7-НЗ-связывающая молекула Е_В13, где указанные модификации, которые уменьшают аффинность вариантного домена Fc для FcγR, включают замещение L234A; L235A; или L234A и L235A, где указанная нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat.

Е_В15. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В13 или Е_В14, где указанные модификации, которые улучшают период полувыведения в сыворотке вариантного домена Fc, включают замещение M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E или K288D и H435K, где указанная нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat.

Е_В16. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В15, где указанная молекула является биспецифической и содержит два эпитопсвязывающих сайта, способных к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом В7-НЗ и два эпитопсвязывающих сайта, способных иммуноспецифически связываться с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки.

Е_В17. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В15, где указанная молекула является биспецифической и содержит один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом В7-НЗ и один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки.

Е_В18. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В15, где указанная молекула является триспецифической и включает:

- (a) один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом В7-НЗ;
- (b) один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом первой молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки; и
- (c) один эпитопсвязывающий сайт, способный к иммуноспецифическому связыванию с эпитопом второй молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки.

Е_В19. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В1-Е_В8, где указанная молекула способна одновременно связываться с В7-НЗ и молекулой, присутствующей на поверхности эффекторной клетки.

Е_В20. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В16-Е_В18, где указанная молекула, присутствующая на поверхности эффекторной клетки, представляет собой CD2, CD3, CD8, TCR или NKG2D.

Е_В21. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В16-Е_В20, где эффекторная клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку или клетку естественный киллер (NK).

Е_В22. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В16-Е_В21, где указанная молекула, присутствующая на поверхности эффекторной клетки, представляет собой CD3.

Е_В23. В7-НЗ-связывающая молекула Е_В18, где указанная первая молекула, присутствующая на поверхности эффекторной клетки, представляет собой CD3, а указанная вторая молекула, присутствующая на поверхности эффекторной клетки, представляет собой CD8.

Е_В24. В7-НЗ-связывающая молекула любого из Е_В16-Е_В23, где указанная молекула опосредует координированное связывание клетки, экспрессирующей В7-НЗ и цитотоксическую Т-клетку.

Е_В25. Фармацевтическая композиция, которая включает эффективное количество В7-НЗ-связывающей молекулы любого из Е_В1-Е_В24 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Е_В26. Применение В7-НЗ-связывающей молекулы любого из Е_В1-Е_В24 или фармацевтической композиции Е_В26 при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией В7-НЗ или характеризующегося экспрессией В7-НЗ.

Е_В27. Применение Е_В26, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией В7-НЗ или характеризующееся экспрессией В7-НЗ, представляет собой рак.

Е_В28. Применение Е_В27, где указанный рак характеризуется наличием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки опухоли надпочечников, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, В-клеточной неоплазии, рака молочной железы, опухоли сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромобной почечно-клеточной карциномы, язвенной карциномы клетки, рака ободочной кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокругло-клеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, опухоли зародышевых клеток, рака головы и шеи, глиобластомы, гемобластозов, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза (например, острого миелоидного лейкоза), липосарко-

мы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC)), медуллобластомы, меланомы, менингиомы, мезотелиомы фарингеального рака, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли паращитовидной железы, детского онкологического заболевания, опухоли периферических нервных оболочек, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, увеальной меланомы заднего полюса, почечного метастатического рака, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, сине-мелкокруглоклеточных опухолей детей (включая нейробластомы и рабдомиосаркомы), саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN)), рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

Е_B29. Применение Е_B27, где указанный рак выбран из группы, состоящей из рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, глиобластомы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Беркетта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы из клеток маргинальной зоны, мезотелиомы фарингеального рака, неходжкинской лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, множественной миеломы, меланомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи, карциномы почек, сине-мелкокруглоклеточных опухолей детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN)), рака яичек, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

Примеры

Теперь, когда изобретение в целом описано, оно станет более понятным при помощи следующих примеров. Следующие примеры иллюстрируют различные способы композиций в диагностических или терапевтических способах изобретения. Примеры предназначены для иллюстрации, но никоим образом не ограничивают объем изобретения.

Пример 1. Получение, гуманизация и определение характеристик анти-В7-Н3 антител.

Моноклональные антитела были получены путем иммунизации мышей жизнеспособными человеческими фетальными клетками-предшественниками или опухолевыми иницирующими/раковыми стволоподобными клетками (CSLC), как описано ранее (Loo et al. (2007) "The glycotope-specific RAV12 monoclonal antibody induces oncosis in vitro and has antitumor activity against gastrointestinal adenocarcinoma tumor xenografts in vivo" *Mol Cancer Ther*; 6: 856-65). Скрининг ИНС опухолеспецифическими mAb идентифицировал панель анти-В7-Н3 (CD276) реактивных mAb с сильно дифференцированным связыванием в опухолевой ткани относительно нормальной ткани. Подмножество анти-В7-Н3-антител, которые были эффективно интернализированы, идентифицировали с применением анализа интернализации, проведенного в 5-дневном анализе, с применением конъюгированного с сапорином антитела против мышинового Fab при 1:1 или 10:1 Fab-ZAP:в соответствии с протоколом производителей (Advanced Targeting Systems). Как показано на фиг. 7, ряд антител против В7-Н3, включая анти-В7-Н3 антитела, обозначенные как "mAb-C", и "mAb-D", были эффективно интернализированы.

Вышеописанные мышинные анти-В7-Н3 mAb: mAb-B, mAb-C и mAb-D используются для образования гуманизированных доменов VL и VH, в которых CDR_L и CDR_H их доменов слиты с каркасными доменами человека. Гуманизированные домены VH и VL затем используются для получения гуманизированных легких цепей, имеющих константную область легкой цепи каппа (т.е. SEQ ID NO:1) и домен CH1 из IgG1, шарнирный домен и домен Fc (т.е. SEQ ID NO:3, 7, 12). Гуманизированные антитела были обозначены как "hmAb-B", "hmAb-C" и "hmAb-D".

Аминокислотные последовательности гуманизированных доменов VL и VH приведены выше. Следует отметить, что CDR hmAb-B могут быть модифицированы для получения альтернативных гуманизированных доменов VL и VH, как описано выше. Аминокислотная последовательность всех гуманизированных легких и тяжелых цепей hmAb-C и hmAb-D приведена выше.

Кинетику связывания гуманизированных антител исследовали с применением анализа Biacore, в котором растворимый гибридный белок В7-Н3 (4Ig) человека или яванского макака с меткой His (shB7-Н3-His или scB7-Н3-His соответственно) пропускали через иммобилизованные антитела. Вкратце, каждое гуманизированное антитело захватывалось иммобилизованным козым Fab₂ против Fc человека и инкубировалось с shB7-Н3-His или scB7-Н3-его (6,25-100 нМ), а кинетику связывания определяли с помощью анализа Biacore. Вычисленные k_a , k_d и K_D из этих исследований с применением аппроксимации двухвалентного связывания представлены в табл. 6. Результаты показывают, что гуманизированные антитела связываются В7-Н3 человека и яванского макака в диапазоне аффинностей.

Таблица 6

Антитело	Человек			Яванский макак		
	K _a (x10 ⁴)	K _d (x10 ⁻⁴)	K _D (нМ)	K _a (x10 ⁴)	K _d (x10 ⁻⁴)	K _D (нМ)
hmAb-B	11,0	0,12	0,11	7,1	2,9	4,1
hmAb-C	16	34	21,3	6,4	31	48,4
hmAb-D	3,4	22	62,9	1,35	77	592,3

Тканевая перекрестная реактивность гуманизированных антител исследовалась иммуногистохимией (ИНС). В табл. 7 приведены результаты нескольких исследований ИНС, выполненных на нормальных тканях человека, тканях опухолей человека, линиях раковых клеток человека и клеточных линиях СНО, экспрессирующих или не экспрессирующих В7-Н3, с применением гуманизированных антител против В7-Н3 в указанных концентрациях антител. Критерий оценки этих исследований приведен в табл. 8.

Таблица 7

Ткань	Образец	hmAb-B 0,313 мкг/мл	hmAb-C 0,625 мкг/мл	hmAb-D 2,5 мкг/мл
Ободочная кишка	MG06-CHTN-94F	epi 2+ (c) эпизодический	клетки lamina propria 1+ (c) очень редко	-
Печень	ILS11103A	гепатоциты 3+ от эпизодического до частого	гепатоциты 2-3+ (m) от редкого до эпизодического	Гепатоциты 1+ (m) редко
Почка	ILS11119D	epi 1+ (c) редкий	-	-
Поджелудочная железа	ILS10266	fibril 3+ (c) редкий	endo 1+ (c, m) очень редко	-
Легкое	MG06-CHTN-85-A-2	пневмоциты 1+ (c) эпизодический	-	-
Сердце	MG06-CHTN-76B	endo 2+ (c) от редкого до эпизодического	endo 1+ (c) очень редко	-
Кожа	MG03-St.Agn-50B	epi 2+ (c) эпизодический	плоскоклеточный epi 1+ (c, m) редкий	-
надпочечник	MG04-St.Agn-22B-A	4+ (m, c) частый	epi 3+ (m, c), от эпизодического до частого	epi 2+ (c, m) от редкого до эпизодического
СА головы и шеи (Плоскоклеточный)	VNM00340-D03	2	2	1
	VNM00302-D01	3	2	1
	II S7068-D04	3	2	1
СА легкого (NSCLC)	ILS2073-D01	3	3	2
	ILS7115-C	3	2	1
	ILS7253-C	2	1	1
	ILS2153-G	3	2	1
ILS-11149-C	2	1 (BV)	1	
Hs700T ABC = 2.1e6	91812	4+ (c, m) частый	4+ (m> c) частый	2-3+ (m)
NCI-H1703 ABC = 8.1e5	033115-1	3-4+ (c) частый	2-3+ (c, m), от эпизодического до частого	±
СНО + В7Н3С3 ABC = 4,9e6	32113	2+ (c) частый	3-4+ (c, m) частый	3+ (m, c)
СНО + В7Н3С12 ABC = 2,2e5	31813	3+ (c) частый	1-2+ (c) от редкого до эпизодического	±
СНО - В7-Н3	060414-2	-	-	-

c: цитоплазма m: мембрана epi: эпителий Tu: опухоль BV: кровеносный сосуд

Таблица 8

Критерии подсчета баллов нормальной ткани:	Критерии подсчета баллов опухоли:
- отрицательный	0 (отрицательный): отсутствие окрашивания
± неоднозначный	1-100% специфически окрашенных клеток с интенсивностью окрашивания 1+ или 1-20% специфически окрашенных клеток с интенсивностью окрашивания 2+
1+ слабый	1 (слабый): интенсивность окрашивания 2+ в 21-79% специфически окрашенных клеток или интенсивность окрашивания 3+ в 1-49% специфически окрашенных клеток
2+ умеренный	2 (умеренный): интенсивность окрашивания 2+ в 80-100% специфически окрашенных клеток или интенсивность окрашивания 3+ в ≥ 50% специфически окрашенных клеток.
3+ сильный	3 (сильный): интенсивность окрашивания 2+ в 80-100% специфически окрашенных клеток или интенсивность окрашивания 3+ в ≥ 50% специфически окрашенных клеток.
4+ очень сильный	3 (сильный): интенсивность окрашивания 2+ в 80-100% специфически окрашенных клеток или интенсивность окрашивания 3+ в ≥ 50% специфически окрашенных клеток.

Эти результаты показывают, что все гуманизированные антитела проявляют связывание с многочисленными опухолевыми клетками, положительными по В7-Н3. hmAb-B проявляет наибольшую реактивность в отношении опухоли в испытуемых условиях, но также проявляет нормальную тканевую реактивность к гепатоцитам печени и надпочечной ткани. hmAb-C проявляет некоторую сниженную реактивность в опухоли по сравнению с hmAb-B, но также проявляет существенно меньшую реактивность с нормальными гепатоцитами печени, а также реакционную способность на менее независимых образцах. hmAb-D обладает общей пониженной реакционной способностью к опухолевым и нормальным тканям. Антитела демонстрируют сопоставимую перекрестную реактивность с тканями яванского макака, хотя hmAb-D связывается с меньшей интенсивностью в этих ИНС-исследованиях. Для минимизации целевой токсичности hmAb-C и hmAb-D могут быть предпочтительными для получения молекул В7-Н3-ADC по изобретению.

Пример 2. Получение В7-Н3-ADC.

Вышеописанные мышинные анти-В7-Н3 mAb: mAb-A, mAb-B, mAb-C и mAb-D использовали для получения химерных антител, в которых домен VL таких антител был объединен с константной областью легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO:1) и в которых домен VH таких антител объединен с CH1-Шарнир-CH2-CH3 константной областью из IgG1 человека (SEQ ID NO:3, 7 и 12 соответственно). Химеризованные антитела ("chmAb-A", "chmAb-B", "chmAb-C" и "chmAb-D") преобразовывали в В7-Н3-ADC посредством конъюгации по цистеину в его В7-Н3-связывающем домене с расщепляемым линкером-

полезной нагрузкой ауристатином E "vc-MMAE" (Concortis Biosystems), как обсуждалось выше.

Пример 3. B7-H3-ADC демонстрируют эффективную активность *in vitro*.

Для того чтобы продемонстрировать противоопухолевую активность B7-H3-ADC по настоящему изобретению, описанный выше B7-H3-ADC (MMAE) инкубировали в концентрациях от 1 до 100000 пМ с экспрессирующими B7-H3 клетками рака молочной железы JMT-1, клетками рака молочной железы MDA-MB-468, клетками меланомы A375.52, клетками немелкоклеточного рака легкого Calu-6, клетками немелкоклеточного рака легкого NCI-H1703, клетками немелкоклеточного рака легкого NCI-H1975, клетками рака яичника PA-1, клетками рака поджелудочной железы Hs700T, клетками рака предстательной железы DU145 или B7-H3-отрицательными клетками В-клеточной лимфомы Raji. Цитотоксичность *in vitro* определяли количественно через 7 дней. Вкратце, B7-H3-ADC и контрольные образцы разводили и помещали в микротитровальные планшеты, 5000 клеток добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 4-7 дней. Реактив аламаровый синий (например, BioRad/ThermoFisher/Invitrogen) добавляли к планшетам и считывали данные в соответствии с протоколом изготовителя. Количество сайтов связывания антител, присутствующих в этих клетках, определяли с помощью набора Bangs QFACS™.

Кривые цитотоксичности из этого исследования представлены на фиг. 8A-8J. Значения IC₅₀ были определены и приведены в табл. 9. Результаты этих исследований показывают, что каждое из протестированных интернализированных антител против B7-H3 проявляло дозозависимую цитотоксичность *in vitro* против экспрессирующих B7-H3 опухолевых клеток. Антитела демонстрировали диапазон активности. Относительная активность в этих анализах составляла: chmAb-C > chmAb-B > chmAb-D > chmAb-A.

Таблица 9

	Клеточная линия									
	Рак молочной железы		Меланома	Немелкоклеточный рак легкого			Рак яичника	Рак поджелудочной железы	Рак предстательной железы	
B7-H3-ADC	JMT-1	MDA-MB-468	A375.52	Calu-6	NCI-H1703	NCI-H1975	PA-1	Hs700T	DU145	
	Сайты связывания антител на клетку (x 10 ⁵)									
	11	4,2	7,5	8,5	8,1	4,8	6,1	21	2,4	
	IC ₅₀ (pM)									
chmAb-A B7-H3 ADC	9100	8095	703	995	1517	26976	8326	607	20153	
chmAb-B B7-H3 ADC	221	352	153	59	90	31	555	159	3770	
chmAb-C B7-H3 ADC	124	201	267	30	43	16	409	109	465	
chmAb-D B7-H3 ADC	735	1383	887	171	219	162	1795	303	2587	

Пример 4. B7-H3-ADC демонстрирует мощную активность *in vivo*.

Чтобы дополнительно продемонстрировать противоопухолевую активность B7-H3-ADC по настоящему изобретению, описанные выше молекулы chmAb-B B7-H3-ADC, chmAb-C B7-H3-ADC и/или chmAb-D B7-H3-ADC (MMAE) оценивали на токсичность *in vivo* в модели голых мышей CD1 с применением различных линий опухолевых клеток. Короче говоря, ~5×10⁶ опухолевых клеток (супендированных 1:1 в среде и MATRIGEL®) подкожно имплантировали в бок голых мышей CD1 (Charles River Laboratories). Когда опухоли достигали объема приблизительно 150 мм³, мышей рандомизировали и B7-H3-ADC или контрольный носитель вводили внутривенно. В этих исследованиях вводили одну дозу B7-H3-ADC или контрольного носителя (qdx1). Опухоли измеряли два раза в неделю путем ортогональных измерений с помощью электронных штангенциркулей, при этом объемы опухолей, рассчитывали как: (длина x ширина x высота)/2. Определяли объем опухоли (относительно контроля) ("T/C").

Обнаружение того, что объем опухоли обработанных животных уменьшился до ≤ 5 мм³ в течение периода исследования, считали полным ответом ("CR").

Активность *in vivo* против опухолевых клеток рака молочной железы MDA-MB-468.

Результаты этого исследования по отношению к опухолевым клеткам рака молочной железы MDA-MB-468 представлены в табл. 10 и на фиг. 9 и показывают респонсивность опухолевых клеток MDA-MB-468.

Таблица 10

Обработка (Начальная доза в день 30)	Доза (мг/кг)	T/C	CR	Ответ
chmAb-B B7-H3 ADC	10	4	6/7	Высокая активность
chmAb-C B7-H3 ADC	10	20	4/7	Высокая активность
chmAb-D B7-H3 ADC	10	8	1/7	Высокая активность

Активность *in vivo* против опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого NCI-H1703.

Результаты этого исследования относительно подкожно имплантированных опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого NCI-H1703 представлены в табл. 11 и на фиг. 10A-10C и показывают респонсивность опухолевых клеток NCI-H1703.

Таблица 11

Обработка (Начальная доза в день 52)	Доза (мг/кг)	T/C	CR	Ответ
chmAb-B B7-H3-ADC	10	28	5/7	Высоко активный
	3	22	3/7	Высоко активный
	1	74	0/7	Активный
chmAb-C B7-H3-ADC	10	0	6/7	Высоко активный
	3	11	5/7	Высоко активный
	1	70	0/7	Активный
chmAb-D B7-H3-ADC	10	32	5/7	Высоко активный
	3	4	6/7	Высоко активный
	1	76	0/7	Активный

Активность *in vivo* против опухолевых клеток рака яичника PA-1.

Результаты этого исследования относительно подкожно имплантированных опухолевых клеток рака яичника PA-1 представлены в табл. 12 и на фиг. 11A-11C и показывают респонсивность опухолевых клеток PA-1.

Таблица 12

Обработка (Начальная доза в день 42)	Доза (мг/кг)	T/C	CR	Ответ
chmAb-B B7-H3-ADC	10	0	6/7	Высоко активный
	3	65	0/7	Активный
	1	105	0/7	Не активный
chmAb-C B7-H3-ADC	10	37	3/7	Высоко активный
	3	76	1/7	Активный
	1	93	0/7	Не активный
chmAb-D B7-H3-ADC	10	11	7/7	Высоко активный
	3	57	1/7	Активный агент
	1	113	0/7	Не активный

Активность *in vivo* против опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого Calu-6.

Результаты этого исследования относительно подкожно имплантированных опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого Calu-6 представлены в табл. 13 и на фиг. 12A-12C и показывают респонсивность опухолевых клеток Calu-6.

Таблица 13

Обработка (Начальная доза в день 20)	Доза (мг/кг)	T/C	CR	Ответ
chmAb-B B7-H3-ADC	10	15	3/7	Высоко активный
	3	35	0/7	Активный
	1	64	0/7	Активный
chmAb-C B7-H3-ADC	10	1	3/7	Высоко активный
	3	87	0/7	Не активный
	1	68	0/7	Активный
chmAb-D B7-H3-ADC	10	39	2/7	Высоко активный
	3	43	0/7	Активный
	1	54	0/7	Активный

Активность *in vivo* против опухолевых клеток меланомы A375.S2.

Результаты этого исследования относительно подкожно имплантированных опухолевых клеток меланомы A375.S2 представлены в табл. 14 и на фиг. 13A-13C и показывают респонсивность клеток меланомы A375.S2.

Таблица 14

Обработка (Начальная доза в день 20)	Доза (мг/кг)	T/C	CR	Ответ
chmAb-B B7-H3-ADC	10	3	2/7	Высоко активный
	3	13	0/7	Высоко активный
	1	65	0/7	Активный
chmAb-C B7-H3-ADC	10	4	1/7	Высоко активный
	3	23	0/7	Высоко активный
	1	70	0/7	Активный
chmAb-D B7-H3-ADC	10	26	0/7	Высоко активный
	3	7	0/7	Высоко активный
	1	80	0/7	Высоко активный

Результаты этих исследований показывают, что каждый из протестированных B7-H3-ADC проявлял значительную дозозависимую противоопухолевую активность *in vivo* по отношению к B7-H3-положительным опухолям в мышинных моделях ксенотрансплантата рака молочной железы, легкого и яичника, а также меланомы.

Фармакокинетику вышеуказанных молекул B7-H3-ADC (MMAE) оценивали у не несущих опухоль голых мышей CD1, путем введения таких молекул внутривенно в разовой дозе 5 мг/кг. Образцы крови собирали в течение 10 дней, а сэндвич-ELISA проводили на сыворотке для количественного определения общего количества антител и интактных концентраций B7-H3-ADC.

Репрезентативные результаты этого исследования, в отношении chmAb-B B7-H3 ADC, chmAb-C B7-H3 ADC, и chmAb-D B7-H3 ADC, представлены на фиг. 14A-14C и в табл. 15 и показывают, что молекулы B7-H3-ADC были очень стабильными, причем период полувыведения составлял приблизительно 2,2-3,6 дня. Период полувыведения конъюгатов был сопоставим с периодом полувыведения неконъюгированных молекул, демонстрируя, что молекулы B7-H3-ADC являются высокостабильными у мышей.

Таблица 15

B7-H3-ADC	Общее анти-B7-H3 антитело		Интактный B7-H3-ADC*	
	T _{1/2} (часы)	AUC (ч * нг/мл)	T _{1/2} (часы)	AUC (ч * нг/мл)
chmAb-B B7-H3 ADC	114,1	4796235	58,9	4032575
chmAb-C B7-H3 ADC	75,9	2698831	52,6	2201893
chmAb-D B7-H3 ADC	177,2	5162024	87,3	3502158

* Конъюгат MMAE.

Пример 5. B7-H3-ADC с расщепляемым линкером - дуокармициновым компонентом.

Сконструировали B7-H3-ADC ("hmAb-C B7-H3-ADC"), имеющий типичный дуокармициновый компонент (DUBA), связанный с аминокислотным остатком части Ab через расщепляемый линкер, конъюгированный с антителом, посредством восстановленных межцепочечных дисульфидов, как описано выше (см. схемы 9A-9I) и Elgersma, R.C. et al. (2014) "Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985", Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835 (см. также WO 02/083180; WO 2010/062171; WO 2011/133039; WO 2015/104359; and WO 2015/185142). Среднее соотношение лекарственное средство/антитело (DAR) составляет около 2-4, обычно около 2,7. Понятно, что точный DAR может варьировать для каждого препарата. Порядок стадий синтеза может изменяться по желанию. Предпочтительно, чтобы используемый способ был описан на схемах 9A-9I, как описано выше, и линкер-DUBA конъюгирован с антителом через восстановленные межцепочечные дисульфиды.

Пример 6. B7-H3-ADC с расщепляемым линкером-дуокармицином сохраняет биологическую активность.

Вышеописанный hmAb-C B7-H3-ADC (имеющий типичный дуокармициновый компонент (DUBA), связанный с аминокислотным остатком части Ab через расщепляемый линкер) ("hmAb-C-DUBA"), инкубировали с клетками в течение 7 дней и определяли жизнеспособность, используя анализ с аламаровым синим, как описано выше. Как показано на фиг. 15A-15C, конструкция hmAb-C-DUBA сохранила биологическую активность, о чем свидетельствует ее цитотоксическая активность на опухолевых клетках, положительная по B7-H3. Аналогичные результаты наблюдались для вышеописанного chmAb-C, связанного с дуокармицином ("chmAb-C-DUBA").

В этом исследовании и дополнительных исследованиях, описанных ниже, молекула, которая связывает несвязанный антиген (CD20), конъюгированный с DUBA ("Ctrl-DUBA"), использовалась в качестве связывающего контрольного ADC для учета неспецифической активности *in vivo* из-за специфической для грызунов карбоксиэстеразы CES1c, присутствующей в плазме грызунов.

Пример 7. B7-H3-ADC демонстрирует мощную противоопухолевую активность *in vivo*.

Было проведено многодозовое исследование для оценки эффективности молекулы *in vivo*. Calu-6, клетки немелкоклеточной карциномы легкого, подкожно имплантировали в группы мышей (n = 5), по существу, как описано выше, которые затем получали дозы hmAb-C-DUBA (1 × 3, 3 мг/кг × 3 или 6 мг/кг × 3) в день 24, 31, 38 и 45 (показанные стрелками) после инокуляции, и животных оценивали по объему опухоли (по существу, как описано выше) вплоть до 62 дня. Как показано на фиг. 16, все три проверенные дозы hmAb-C-DUBA оказались эффективными в снижении или устранении объема опухоли. Calu-6 продемонстрировали балл ИНС 2+, а сайты связывания антител на клетку (ABC) представлены в табл. 9.

Во втором исследовании *in vivo* (выполняемом, по существу, как описано выше), клетки немелкоклеточной карциномы легкого Calu-6 были подкожно имплантированы в группы мышей (n = 7), которые затем получали разовую дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (3 или 10 мг/кг) на 20-й день (показано стрелкой). В табл. 16 и 17 приведены результаты и показано, что введение hmAb-C-DUBA значительно уменьшает объем опухоли.

Таблица 16

Обработка	Доза - QW (мг/кг)	Объем опухоли обработка/контроль %	Полная ремиссия
hmAb-C-DUBA	10	8	0/7
hmAb-C-DUBA	3	41	0/7
Ctrl-DUBA	10	71	0/7
Ctrl-DUBA	3	71	0/7

В третьем исследовании *in vivo* (выполняемом, по существу, как описано выше) клетки карциномы яичника PA-1 подкожно имплантировали в группы мышей (n = 6), которые затем получали разовую дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (1 мг/кг, 6 мг/кг или 10 мг/кг) в день 25 (показано стрелкой). В табл. 17 и на фиг. 18 приведены результаты и показано, что введение hmAb-C-DUBA значительно уменьшало объем опухоли и приводило к полной ремиссии до половины обработанных животных.

Таблица 17

Обработка	Доза - QW (мг/кг)	Объемная обработка/контроль опухоли%	Полная ремиссия
hmAb-C-DUBA	10	11	3/6
hmAb-C-DUBA	6	9	2/6
hmAb-C-DUBA	3	57	1/6
Ctrl-DUBA	10	84	0/6
Ctrl-DUBA	6	89	0/6
Ctrl-DUBA	3	111	0/6

Мощная *in vivo* активность наблюдаются также против клеток меланомы A375.S2. Такие клетки подкожно имплантировали в группы мышей ($n = 7$) (по существу, как описано выше), которые затем получали разовую дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (1 или 3 мг/кг) в день 25 (показано стрелкой). В табл. 18 и на фиг. 19 приведены результаты и показано, что введение hmAb-C-DUBA значительно уменьшало объем опухоли и приводило к полной ремиссии у 5/7 обработанных животных при более высокой дозе.

Таблица 18

Обработка	Доза - QW (мг/кг)	Объем опухоли обработка/контроль %	Полная ремиссия
hmAb-C-DUBA	3	1	5/7
hmAb-C-DUBA	1	16	1/7
Ctrl-DUBA	3	33	0/7
Ctrl-DUBA	1	70	1/7

Мощная *in vivo* активность наблюдались против клеток карциномы молочной железы MDA-MB468. Такие клетки были имплантированы в жировое тело молочной железы групп мышей ($n = 5$) (по существу, как описано выше), которые затем получали либо разовую дозу hmAb-C-DUBA, либо Ctrl-DUBA (3 или 6 мг/кг) в день 70 или три дозы hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (3 мг/кг (показано стрелками)). Животных оценивали по объему опухоли (по существу, как описано выше) на срок до 110 дней. Клетки MDA-MB468 демонстрировали балл ИНС 2+, и ABC представлен в табл. 9. Результаты представлены в табл. 19 и на фиг. 20A-20D. На фиг. 20A показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 6 мг/кг (разовая доза). На фиг. 20B показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 3 мг/кг (разовая доза). На фиг. 20C показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 3 мг/кг (три дозы). На фиг. 20D показаны все результаты на одном графике. Данные показывают, что предоставление hmAb-C-DUBA значительно уменьшало объем опухоли и достигало полной ремиссии у 4/5 обработанных животных при более высокой дозе, и что предоставление повторных доз значительно улучшало исход обработки.

Таблица 19

Обработка	Доза - QW (мг/кг)	Объем опухоли обработка/контроль %	Полная ремиссия
hmAb-C-DUBA	6	1	4/5
hmAb-C-DUBA	3	51	1/5
hmAb-C-DUBA	3 x 3 дозы	2	3/5
Ctrl-DUBA	6	41	0/5
Ctrl-DUBA	3	43	0/5
Ctrl-DUBA	3 x 3 дозы	53	0/5

В дальнейшем исследовании ксенотрансплантаты клеток карциномы яичника PA-1 ($\sim 5 \times 10^6$, суспендированных 1:1 в среде и MATRIGEL®) подкожно вводили в группы мышей, которые затем получали дозу hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA (однократная доза 3, 6 или 10 мг/кг) на 24 день после инокуляции или две дозы 10 мг/кг hmAb-C-DUBA (на 24 и 24 днях 28 после инокуляции) или четыре дозы 6 мг/кг hmAb-C-DUBA (в дни 24, 28, 31 и 35 после инокуляции). Животных оценивали по объему опухоли вплоть до 70 дней (по существу, как описано выше). Клетки PA-1 показали балл ИНС 2+, и ABC представлен в таб. 9. Фиг. 21A-21D обобщают результаты. На фиг. 21A показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA при 10 мг/кг (разовая или двойная доза). На фиг. 21B показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA при 6 мг/кг (однократная или четырехкратная доза). На фиг. 21C показаны результаты для носителя, hmAb-C-DUBA или Ctrl-DUBA по 3 мг/кг (разовые дозы). На фиг. 21D показаны все результаты на одном графике. Данные показывают, что предоставление hmAb-C-DUBA значительно уменьшало объем опухоли у обработанных животных.

Пример 8. Фармакокинетика B7-H3-ADC.

Фармакокинетику вышеописанного chmAb-C-DUBA исследовали, используя логарифмический/линейный график общих IgG или кривой интактного ADC у мышей ($n = 3$), каждая из которых получала одну внутривенную дозу chmAb-C-DUBA (5 мг/кг). Результаты представлены на фиг. 22.

Фармакокинетику hmAb-C-DUBA исследовали, используя логарифмический/линейный график общих IgG или кривой интактного ADC у яванского макака, каждый из которых получал одну внутривенную дозу hmAb-C-DUBA (1 мг/кг (1 самец, 1 самка), 3 мг/кг (1 самец, 1 самка), 10 мг/кг (1 самец, 1 самка) или 27 мг/кг (2 самца, 2 самки)). Результаты показаны на фиг. 23A (общие IgG) и 23B (интактный ADC).

В этих исследованиях общий IgG определяли с помощью ELISA. Вкратце, образцы, стандарты и контрольные образцы сыворотки были зафиксированы на микротитровальных планшетах, покрытых козьим антителом против IgG человека (H + L). После промывки планшеты инкубировали с козьим антителом против Fc из IgG человека, конъюгированным с пероксидазой. После промывки давали развиться в планшетах окраске с субстратом 3, 3', 5'-тетраметилбензидином (ТМБ), реакцию останавливали фос-

форной кислотой и планшеты считывали при 405 нм. Общий IgG в тестовых образцах рассчитывали по стандартной кривой. Интактный ADC также определяли с помощью ELISA. Вкратце, мышиное mAb против дуокармицина иммобилизовали на планшетах для микротитрования. После промывки планшеты инкубировали с козьим антителом против Fc из IgG человека, конъюгированным с пероксидазой. После промывки давали развиться в планшетах окраске с субстратом с 3, 3', 5', 5'-тетраметилбензидином (TMB), реакцию останавливали фосфорной кислотой и планшеты считывали при 405 нм. Интактный ADC в тестовых образцах рассчитывали по стандартной кривой.

Фармакокинетические параметры для дозы 5 мг/кг для мыши и доз 3 и 10 мг/кг для яванского макака были получены путем сравнения таких данных и суммирования в табл. 20 (где AUC Last обозначает область под кривой от начала до конца наблюдения). Воздействие на мышью интактного ADC ограничено из-за карбоксистеразы CES1c, специфичной для грызунов. Эти данные указывают на большой терапевтический индекс в преclinical условиях.

Таблица 20

Вид	доза (мг/кг)	T _{1/2} (ч)	C _{max} (нг/мл)	AUC Last (ч * мг/мл)
мышь	5	ND	5909	45
яванский макак	3	62,7	113484	3798
яванский макак	10	57,3	330983	17978

Пример 9. Определение характеристик анти-B7-H3 диател.

Биспецифические двухцепочечные и трехцепочечные диатела B7-H3 x CD3 оценивали для того, чтобы определить их способность опосредовать перенацеленное уничтожение клеток и/или выделение цитокинов из клеток-мишеней, экспрессирующих на поверхности B7-H3 клеток. Перенацеленное уничтожение клеток исследовали с применением анализа цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Вкратце, биспецифические антитела B7-H3 x CD3 (или отрицательное контрольное диатело, которое связывает нерелевантный антиген вместо B7-H3), инкубировали в течение 24 ч с эффекторными пан Т-клетками и целевыми B7-H3-экспрессирующими опухолевыми клетками при соотношении эффектор:клетка-мишень 10:1. Процентная цитотоксичность (т.е. гибель клеток) определялась путем измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среду поврежденными клетками. Высвобождение цитокинов исследовали с применением аналогичного формата. Вкратце, биспецифические антитела B7-H3 x CD3 (или отрицательные контрольные диатела, лишенные B7-H3-связывающего сайта), инкубировали в течение 24 ч с эффекторными клетками PBMC отдельно или в присутствии целевых опухолевых клеток (например, клеток карциномы легкого SK-MES-1) при соотношении эффектор:мишень 10: 1 или 30: 1 и определяли выделение цитокинов IFN γ , TNF- и IL-10. Анализ показывает способность биспецифических диател B7-H3 x CD3 опосредовать перенацеленное уничтожение клеток и высвобождение цитокинов.

Все публикации и патенты, упомянутые в этом описании, включены в данный документ ссылкой в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки в полном объеме. Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными воплощениями, следует понимать, что оно способно к дальнейшим модификациям, и эта заявка предназначена для охвата любых изменений, применений или адаптаций по изобретению, следуя, в общем, принципам изобретения и включая такие отклонения от настоящего раскрытия, которые входят в известную или обычную практику в области, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к основным признакам, изложенным выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула, связывающая B7-H3, где указанная молекула, связывающая B7-H3, является антителом, диателом или их антигенсвязывающим фрагментом, который способен связывать B7-H3, где указанная молекула, связывающая B7-H3, содержит:

(i) гуманизированный домен варибельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; и

(ii) гуманизированный домен варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

2. Молекула, связывающая B7-H3 по п.1, которая также содержит Fc домен из IgG человека.

3. Молекула, связывающая B7-H3 по п.2, где указанный IgG человека является IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека.

4. Молекула, связывающая B7-H3 по п.2, где указанный IgG человека является IgG1 человека.

5. Молекула, связывающая B7-H3 по любому из пп.2-4, где указанный домен Fc является модифицированным Fc доменом, который содержит:

(a) одну или несколько аминокислотных модификаций, которые снижают аффинность модифицированного домена Fc к Fc γ R, где аминокислотные модификации, которые снижают аффинность модифицированного домена Fc к Fc γ R, включают замены L234A; L235A или L234A и L235A, где указанная нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat; и/или

(b) одну или несколько модификаций, которые увеличивают период полужизни в сыворотке у модифицированного домена Fc, где модификации, которые увеличивают период полужизни в сыворотке у модифицированного домена Fc, содержат замены M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E или K288D и H435K, где указанная нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat.

6. Молекула, связывающая B7-H3 по любому из пп.1-5, где указанная молекула, связывающая B7-H3, является антителом или его эпитоп-связывающим фрагментом.

7. Конъюгат анти-B7-H3 антитела и лекарственного средства (B7-H3-ADC), который имеет формулу



где Ab представляет собой гуманизированное B7-H3 антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент и содержит:

(i) гуманизированный домен вариабельной области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; и

(ii) гуманизированный домен вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21;

D представляет собой цитотоксический лекарственный компонент;

LM представляет собой по меньшей мере одну связь или линкерную молекулу, которая ковалентно связывает Ab и D;

m представляет собой целое число от 0 до n и обозначает количество LM в B7-H3-ADC;

n представляет собой целое число от 1 до 10 и обозначает количество цитотоксических лекарственных компонентов, ковалентно связанных с молекулой B7-H3-ADC.

8. Конъюгат по п.7, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных LM-компонентов представляет собой линкерную молекулу.

9. Конъюгат по п.8, отличающийся тем, что линкерная молекула LM представляет собой пептидный линкер.

10. Конъюгат по п.9, отличающийся тем, что пептидный линкер представляет собой дипептидный линкер валин-цитруллин.

11. Конъюгат по п.9 или 10, отличающийся тем, что линкерная молекула LM дополнительно включает пара-аминобензилоксикарбонильный самоэлиминирующийся спейсер между пептидным линкером и D.

12. Конъюгат по пп.9-11, отличающийся тем, что линкерная молекула LM дополнительно включает малеимидный линкерный компонент между пептидным линкером и Ab.

13. Конъюгат по любому из пп.7-12, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин, радиоизотоп, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, микроРНК, микроРНК, фотоактивный терапевтический агент, антиангиогенный агент, проапоптотический агент, пептид, липид, углевод, хелатирующий агент или их комбинации.

14. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин и выбран из группы, состоящей из тубулизина, ауристати́на, майтанзиноида, калихеамицина, пирролобензодиазепина, дуокармицина, экзотоксина Pseudomonas, токсина Diphtheria, ботулинического токсина А, ботулинического токсина В, ботулинического токсина С, ботулинического токсина D, ботулинического токсина Е, ботулинического токсина F, рицина, абрина, сапорина и их цитотоксических фрагментов.

15. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин тубулизина и выбран из группы, состоящей из тубулизина А, тубулизина В, тубулизина С и тубулизина D.

16. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин ауристин и выбран из группы, состоящей из ММАЕ (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-норэфедрин) и ММАF (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-фенилаланин).

17. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин майтанзиноида и выбран из группы, состоящей из майтанзина, DM1 и DM4.

18. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин калихеамицина и выбран из группы, состоящей из калихеамицина γ 1, калихеамицина β 1Br, калихеамицина γ 1Br, калихеамицина α 2I, калихеамицина α 3I, калихеамицина β 1I, калихеамицина γ 1I и калихеамицина Δ 1I.

19. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D содержит цитотоксин пирролобензодиазепина и выбран из группы, состоящей из вадастуксимаба талирина, SJG-136, SG2000, SG2285 и SG2274.

20. Конъюгат по п.13, где указанный цитотоксин является цитотоксином дуокармицина.

21. Конъюгат по п.20, где цитотоксин дуокармицина выбран из группы, состоящей из дуокармицина А, дуокармицина В1, дуокармицина В2, дуокармицина С1, дуокармицина С2, дуокармицина D, дуо-

кармицина SA, CC-1065, адозелезина, бизелезина, карцелезина (U-80244), секо-дуокармицина и спиро-дуокармицина (DUBA).

22. Конъюгат по п.21, где указанный цитотоксический лекарственный компонент D включает секо-дуокармицин.

23. Молекула, связывающая B7-H3 по любому из пп.1-6, или конъюгат по любому из пп.7-22, где указанная молекула, связывающая B7-H3, содержит домен константной области цепи каппа IgG человека.

24. Молекула, связывающая B7-H3 или конъюгат по п.23, где домен константной области цепи каппа IgG человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

25. Конъюгат по любому из пп.7-24, где Ab представляет собой указанное гуманизованное B7H3 антитело и указанное антитело содержит:

(i) легкую цепь, содержащую переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20 и каппа-домен CL последовательности SEQ ID NO:1; и

(ii) тяжелую цепь, содержащую переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, домен CH1 последовательности SEQ ID NO:3, шарнирный домен последовательности SEQ ID NO:7 и домен Fc, содержащий домен CH2-CH3 последовательности SEQ ID NO:12;

указанный D содержит секо-дуокармицин и

указанный LM содержит линкерную молекулу, содержащую малеимидную линкерную группу, дипептидный линкер валин-цитруллин и группу аминокислотоксибензилкарбонил.

26. Фармацевтическая композиция, которая включает B7-H3-связывающую молекулу по любому из пп.1-6 или конъюгат по любому из пп.7-25 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

27. Применение B7-H3-связывающей молекулы, конъюгата или фармацевтической композиции по любому из пп.1-26 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с экспрессией B7-H3 или характеризующегося экспрессией B7-H3.

28. Применение по п.27, отличающееся тем, что указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией B7-H3 или характеризующееся экспрессией B7-H3, представляет собой рак.

29. Применение по п.28, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, рака желудка, глиобластомы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Беркетта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы из клеток маргинальной зоны, мезотелиомы фарингеального рака, неходжкинской лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, множественной миеломы, меланомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи, карциномы почек, сине-мелкоклеточных опухолей детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), плоскоклеточного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN), рака яичка, рака щитовидной железы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

30. Применение по п.28, где указанный рак выбран из группы, включающей острый миелоидный лейкоз, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластому, плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN), рак предстательной железы и метастатический рак щитовидной железы.

31. Применение по п.28, где указанный рак является раком предстательной железы.

32. Применение по п.28, где указанный рак является раком молочной железы.

33. Применение по п.28, где указанный рак является немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

34. Применение B7-H3-связывающей молекулы, конъюгата или фармацевтической композиции по любому из пп.1-26 при получении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с экспрессией B7-H3 или характеризующегося экспрессией B7-H3.

35. Применение по п.34, отличающееся тем, что указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией B7-H3 или характеризующееся экспрессией B7-H3, представляет собой рак.

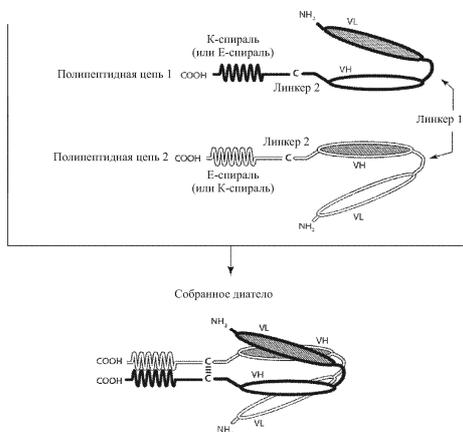
36. Применение по п.35, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, рака желудка, глиобластомы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Беркетта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток зоны мантии, лимфомы из клеток маргинальной зоны, мезотелиомы фарингеального рака, неходжкинской лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, множественной миеломы, меланомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи, карциномы почек, сине-мелкоклеточных опухолей детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), плоскоклеточного рака (например, плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN), рака яичка, рака щитовидной железы (например, метастатического рака щитовидной железы) и рака матки.

37. Применение по п.35, где указанный рак выбран из группы, включающей острый миелоидный лейкоз, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластому, плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN), рак предстательной железы и метастатический рак щитовидной железы.

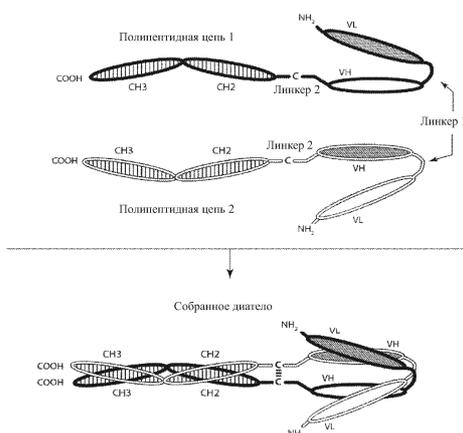
38. Применение по п.35, где указанный рак является раком предстательной железы.

39. Применение по п.35, где указанный рак является раком молочной железы.

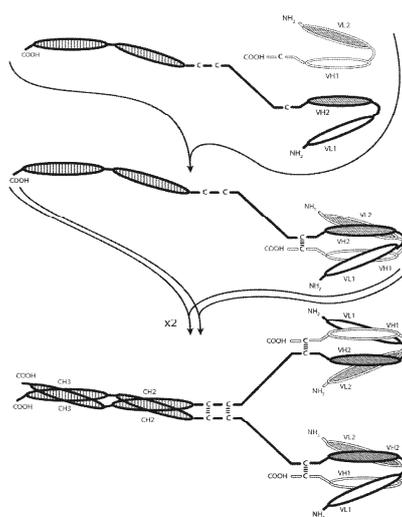
40. Применение по п.35, где указанный рак является немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).



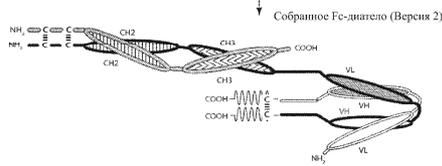
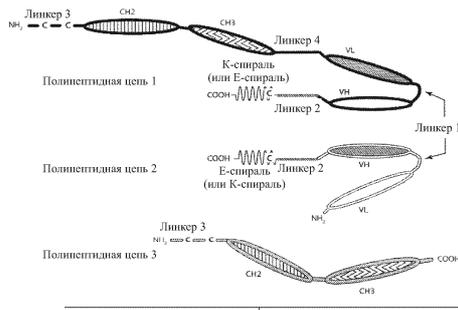
Фиг. 1



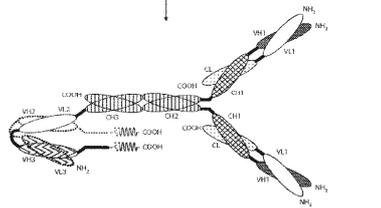
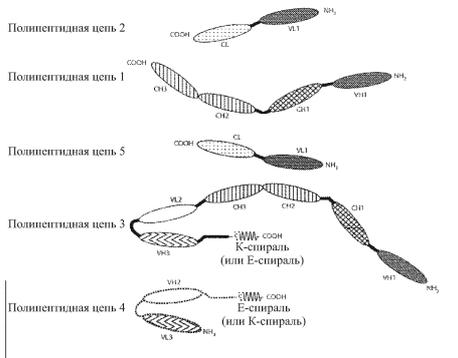
Фиг. 2



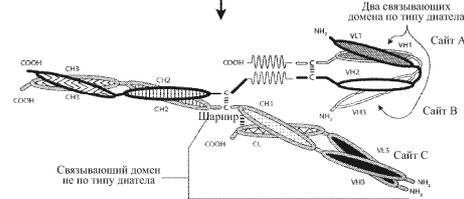
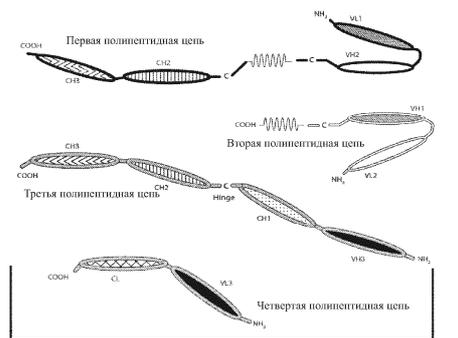
Фиг. 3А



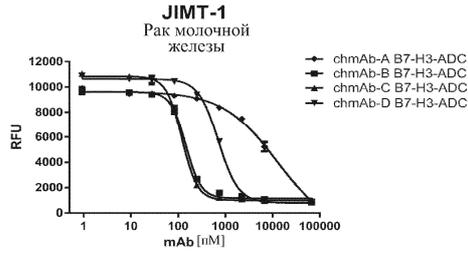
Фиг. 4В



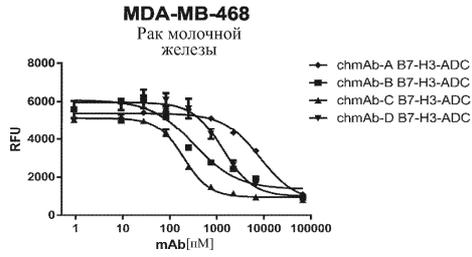
Фиг. 5



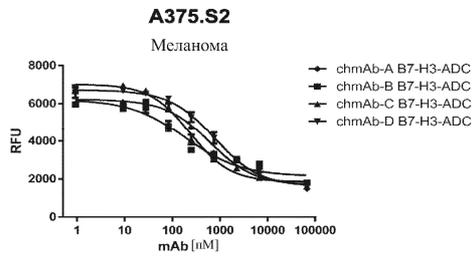
Фиг. 6А



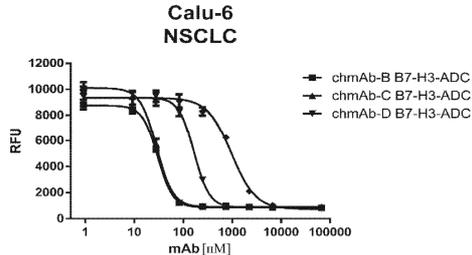
Фиг. 8А



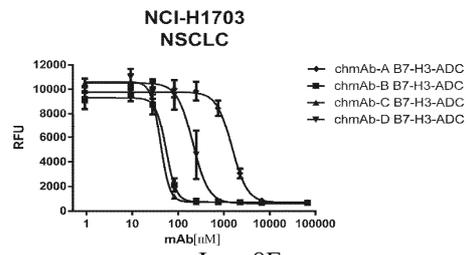
Фиг. 8В



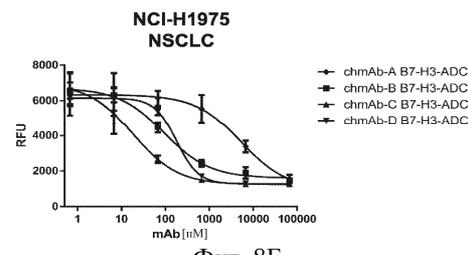
Фиг. 8С



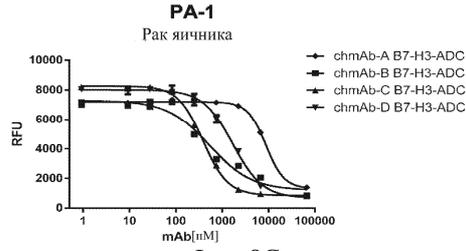
Фиг. 8D



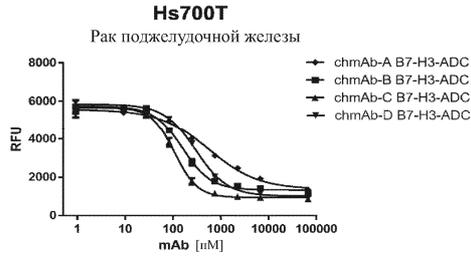
Фиг. 8Е



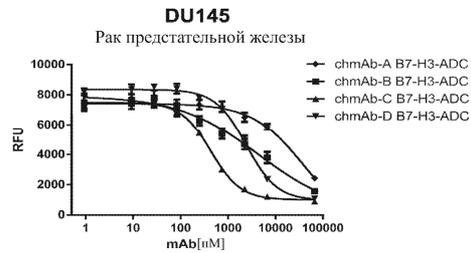
Фиг. 8F



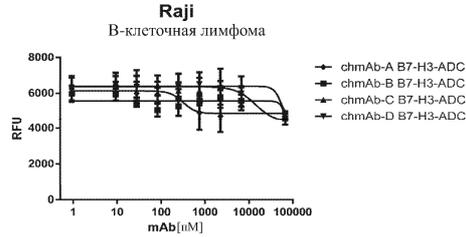
Фиг. 8G



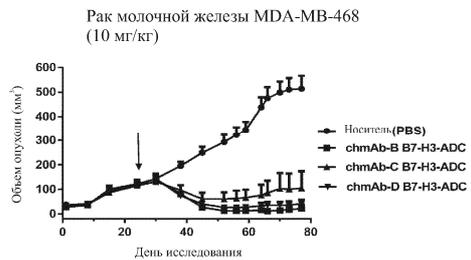
Фиг. 8H



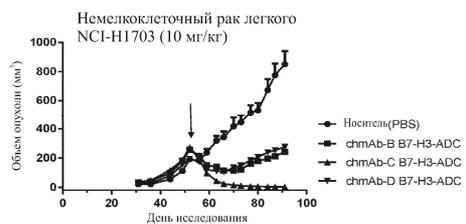
Фиг. 8I



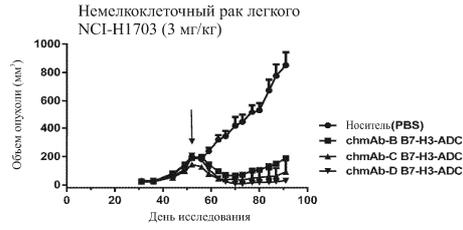
Фиг. 8J



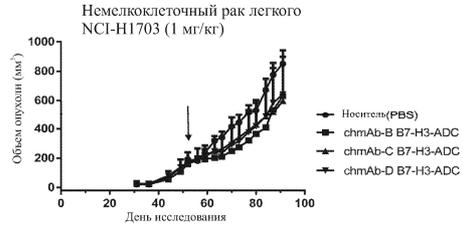
Фиг. 9



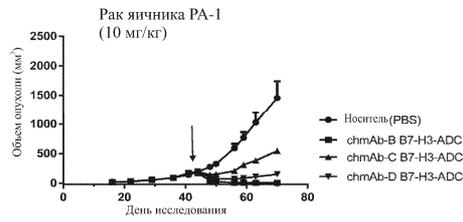
Фиг. 10А



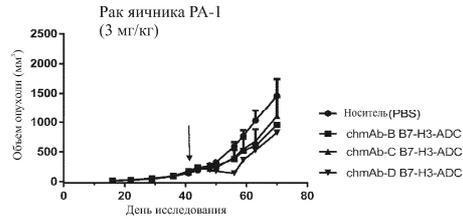
Фиг. 10В



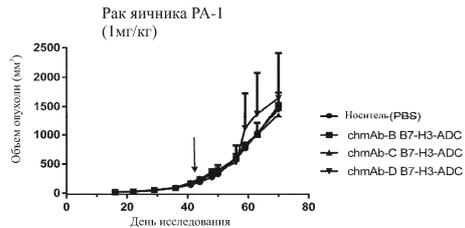
Фиг. 10С



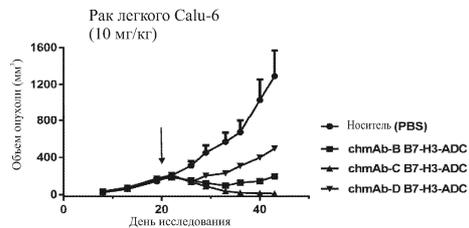
Фиг. 11А



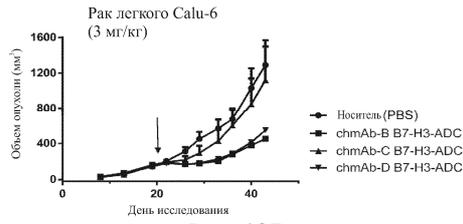
Фиг. 11В



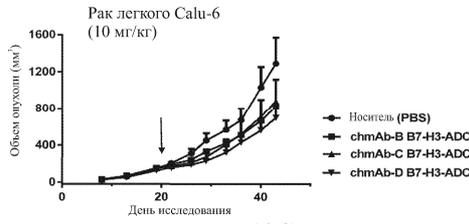
Фиг. 11С



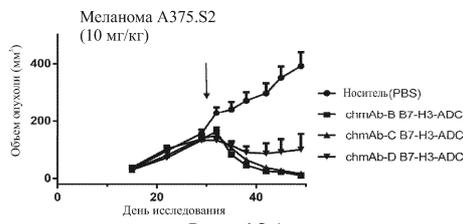
Фиг. 12А



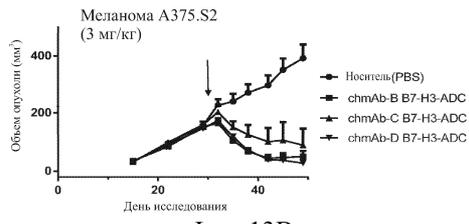
Фиг. 12В



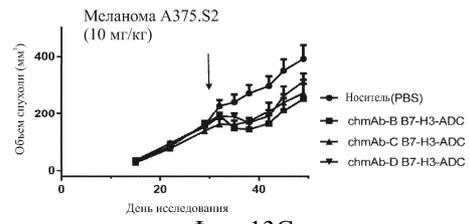
Фиг. 12С



Фиг. 13А

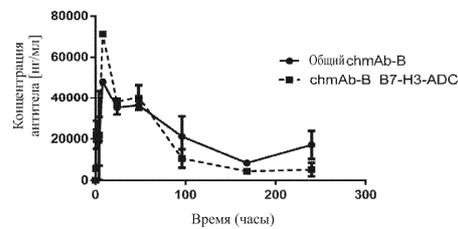


Фиг. 13В



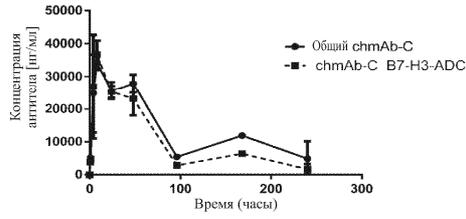
Фиг. 13С

chmAb-B



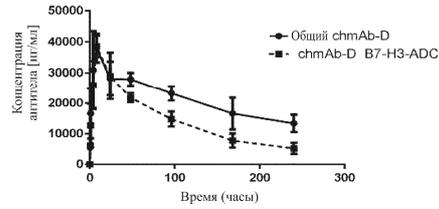
Фиг. 14А

chmAb-C



Фиг. 14В

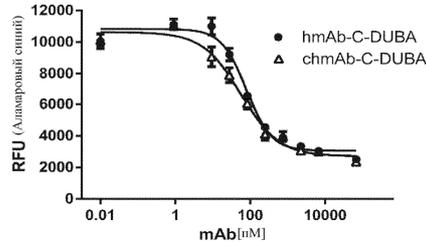
chmAb-D



Фиг. 14С

Calu-6

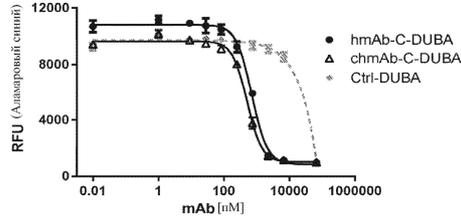
Инкубация 7 дней



Фиг. 15А

NCI-H1703

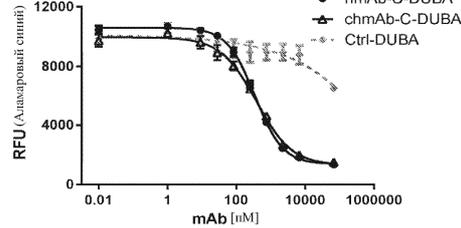
Инкубация 7 дней



Фиг. 15В

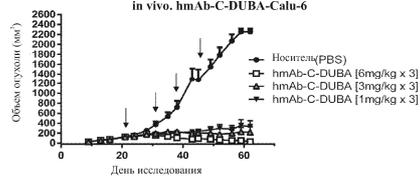
Hs700T

Инкубация 7 дней

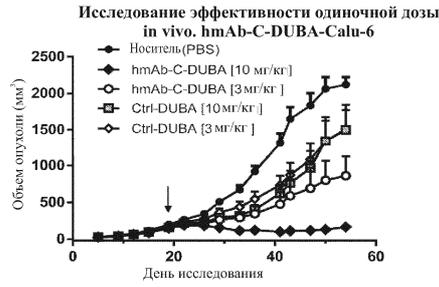


Фиг. 15С

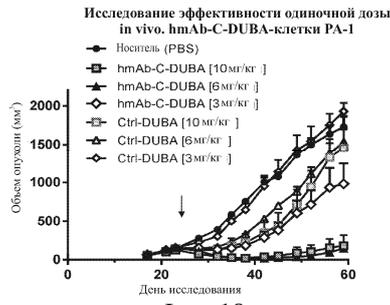
Исследование эффективности множественной дозы in vivo. hmAb-C-DUBA-Cal6



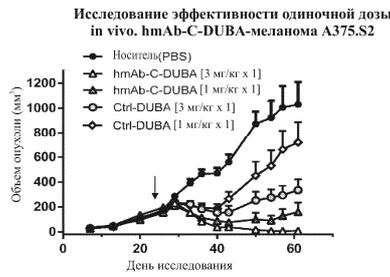
Фиг. 16



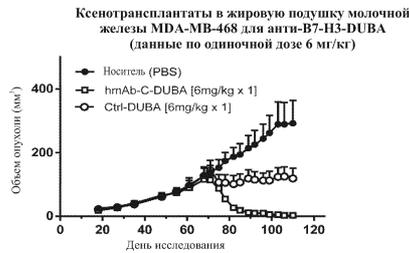
Фиг. 17



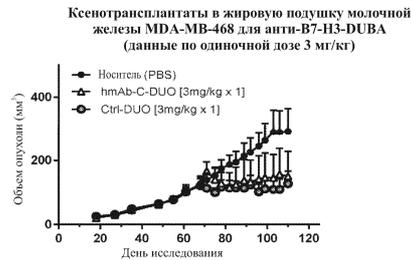
Фиг. 18



Фиг. 19

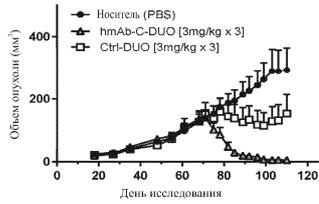


Фиг. 20А



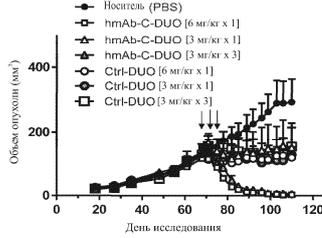
Фиг. 20В

Ксенотрансплантаты в жировую подушку молочной железы MDA-MB-468 для анти-V7-H3-DUBA (данные по тройной дозе 3 мг/кг)



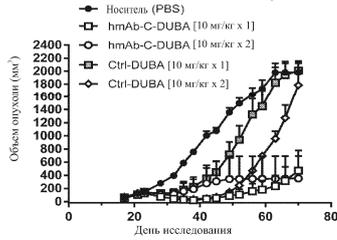
Фиг. 20С

Ксенотрансплантаты в жировую подушку молочной железы MDA-MB-468 для анти-V7-H3-DUBA (все данные)



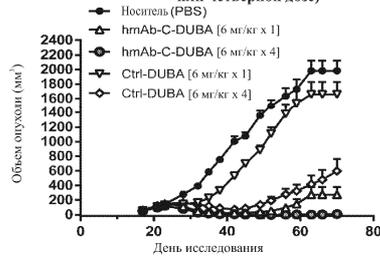
Фиг. 20D

Подкожные ксенотрансплантаты PA-1 для анти-V7-H3-DUBA (10 мг/кг одиночная или двойная доза)



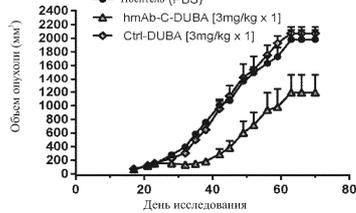
Фиг. 21А

Подкожные ксенотрансплантаты PA-1 для анти-V7-H3-DUBA (по 6 мг/кг одиночной или четверной дозе)

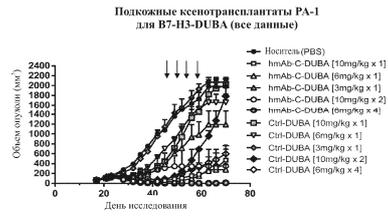


Фиг. 21В

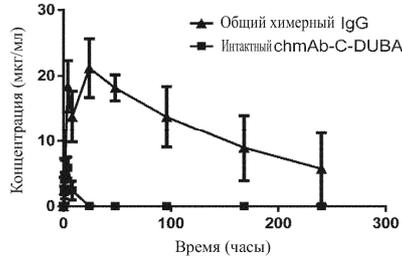
Подкожные ксенотрансплантаты PA-1 для анти-V7-H3-DUBA (3 мг/кг, одиночная доза)



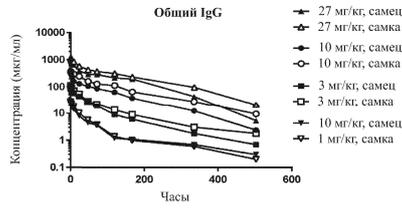
Фиг. 21С



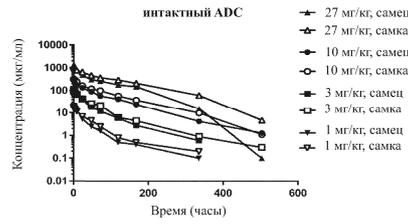
Фиг. 21D



Фиг. 22



Фиг. 23A



Фиг. 23B

