

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391958 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.11.07

(22) Дата подачи заявки  
2022.01.04

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НАЦЕЛЕННЫЕ НА В7Н4 КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/133,707; 63/172,968

(32) 2021.01.04; 2021.04.09

(33) US

(86) PCT/US2022/011119

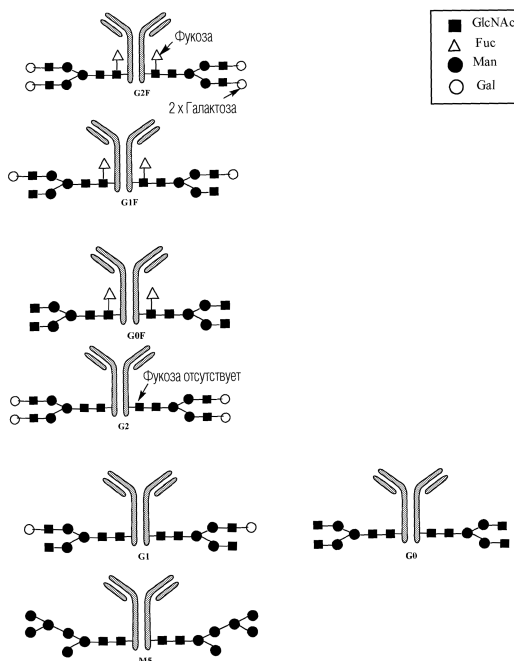
(87) WO 2022/147532 2022.07.07

(71) Заявитель:  
МЕРСАНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Лаундджер Тимоти Б., Чин Чэнь-Ни,  
Деймелин Марк И., Тоадер Дорин  
(US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится, главным образом, к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим моноклональные антитела, которые специфически связываются с В7-Н4 человека в растворимой форме или связанным с мембраной (т.е. при экспрессии на клеточной поверхности) и к способам применения этих конъюгатов в качестве терапевтических и/или диагностических средств.



A1

202391958

202391958

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578648EA/061

### НАЦЕЛЕННЫЕ НА В7Н4 КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[001]** По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 63/133707, поданной 4 января 2021 года, и предварительной заявки США № 63/172968, поданной 9 апреля 2021 года. Содержание каждой из этих заявок включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[002]** Содержимое текстового файла под названием "MRSN-034\_001WO\_SeqList.txt", который был создан 3 января 2022 года и имеет размер 118 т.п.н., включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[003]** В7-Н4, также известный как В7-Н4, В7х, В7S1, В7-S1 и VTCN1, представляет собой трансмембранный белок типа I и является представителем суперсемейства белков В7, которые обеспечивают вспомогательный сигнал к антигенному сигналу Т-клеточного рецептора. В7-Н4 является негативным регулятором функции Т-клеток, и связывание с Т-клетками ингибирует их рост, секрецию цитокинов и цитотоксичность. Устранение В7-Н4 у мышей не влияет на гомеостаз иммунных клеток и не вызывает признаков аутоиммунитета. Рецептор для В7-Н4 не известен и не идентифицирован.

**[004]** В7-Н4 человека картирован на хромосоме 1 и состоит из шести экзонов и пяти интронов, охватывающих 66 т.п.н., среди которых экзон 6 используется для альтернативного сплайсинга с образованием двух разных транскриптов. Он представляет собой белок из 282 аминокислот (включающий N-концевую сигнальную последовательность), и спрогнозировано, что 227 из этих аминокислот находятся во внеклеточном пространстве после отщепления N-концевой сигнальной последовательности. В7-Н4 содержит Ig-подобный V-домен, Ig-подобный C-домен, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост.

**[005]** В то время как экспрессия В7-Н4 в здоровых тканях относительно ограничена на белковом уровне, В7-Н4 неизменно сверхэкспрессируется в нескольких солидных опухолях, таких как гинекологические карциномы молочной железы, яичника и эндометрия. Экспрессия В7-Н4 в опухолях имеет тенденцию к корреляции с плохим прогнозом. Рецептор для В7-Н4 не известен, однако полагают, что он экспрессируется на Т-клетках. Полагают, что В7-Н4 прямо ингибирует активность Т-клеток.

**[006]** Доступно широкое множество терапевтических режимов для лечения развернутых злокачественных опухолей, включая лучевую терапию, общепринятую химиотерапию цитотоксическими противоопухолевыми средствами, гормональную терапию (ингибиторы ароматазы, аналоги рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона), бисфосфонаты и ингибиторы передачи сигнала. Однако, к сожалению, многие пациенты

либо плохо отвечают, либо совсем не отвечают на какие-либо из этих способов терапии. Таким образом, существует потребность в идентификации новых терапевтических средств, которые нацелены на биологическую активность В7-Н4.

**[007]** Таким образом, существует потребность в терапевтических средствах, которые нацелены на биологическую активность В7-Н4.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[008]** В некоторых аспектах изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывает В7-Н4, содержащему определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

**[009]** В некоторых аспектах выделенное антитело содержит варибельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и варибельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых аспектах, выделенное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых аспектах выделенное антитело содержит варибельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и варибельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых аспектах, выделенное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

**[010]** В некоторых аспектах выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых аспектах выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело кролика, мыши, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело. В некоторых аспектах выделенное антитело представляет собой антитело изотипа IgG. В некоторых аспектах выделенное антитело представляет собой антитело изотипа IgG1.

**[011]** В некоторых аспектах выделенное антитело конкурирует за специфическое

связывание В7-Н4 человека с выделенным антителом, содержащим определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55). В некоторых аспектах выделенное антитело конкурирует за специфическое связывание В7-Н4 человека с выделенным антителом, содержащим варибельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и варибельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, или с выделенным антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

**[012]** В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгату антитело против В7-Н4-лекарственное средство, содержащему выделенное антитело по изобретению.

**[013]** В некоторых аспектах предусматривается одна или несколько частей линкер-лекарственное средство, ковалентно связанных с нацеливающей частью, где каждая часть линкер-лекарственное средство содержит многофункциональный линкер, который соединяет нацеливающую часть с одним или несколькими лекарственными элементами (например, одно или несколько терапевтических средств (D)) через посредничество высвобождаемого сборочного элемента для каждого лекарственного элемента, и соединяет гидрофильную группу с лекарственными элементами каждой части линкер-лекарственное средство; высвобождаемый сборочный элемент способен высвободить свободное лекарственное средство вблизи целевой области, на которую нацелена нацеливающая часть; и многофункциональный линкер содержит пептидную часть между нацеливающей частью и гидрофильной группой, где пептидная часть содержит по меньшей мере две аминокислоты.

**[014]** В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгату, выбранному из любого из конъюгатов таблицы А1 и таблицы А2.

**[015]** В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгату, выбранному из любого из конъюгатов, приведенных в таблице В1 и таблице В2.

**[016]** В некоторых аспектах изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом,



включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества конъюгата по изобретению.

**[017]** В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгату для применения для лечения или предупреждения заболеваний у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[018]** В некоторых аспектах изобретение относится к применению конъюгата по изобретению для производства лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах изобретение относится к применению конъюгата по изобретению для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[019]** В некоторых аспектах способа, конъюгата или применения согласно любому из вариантов осуществления указанный конъюгат высвобождает одно или несколько терапевтических средств при биodeградации.

**[020]** В некоторых аспектах способа, конъюгата или применения согласно любому из вариантов осуществления изобретения заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых аспектах способа, конъюгата или применения согласно любому из вариантов осуществления изобретения злокачественная опухоль представляет собой положительную по B7-H4 злокачественную опухоль.

**[021]** В некоторых аспектах способа, конъюгата или применения согласно любому из вариантов осуществления изобретения положительная по B7-H4 злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из карциномы желчных протоков, рака молочной железы, рака эндометрия, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака тела матки, рака щитовидной железы, рака почки, рака головы и шеи, рака желудка, меланомы, карциномы желчных протоков, холангиокарциномы, рака поджелудочной железы, рака толстого кишечника и рака мочевого пузыря.

**[022]** В некоторых аспектах индивидуумом является человек.

**[023]** В некоторых аспектах изобретение, кроме того, включает введение терапевтического средства индивидууму.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**[024]** На **фиг.1** представлен график, демонстрирующий разные гликоформы гликана антитела (G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F и M5).

**[025]** На **фиг.2** представлена схема, демонстрирующая дегликозилирование смеси гликоформ G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F и M5 в присутствии эндогликозидазы.

**[026]** На **фиг.3** представлена схема, демонстрирующая процесс получения азидо-модифицированного антитела, где промежуточное антитело, содержащее концевую часть GlcNAc, подвергают реакции с азидо-модифицированной молекулой-производным UDP-GalNAc в присутствии гликозилтрансферазы.

**[027]** На **фиг.4** представлена схема, демонстрирующая вариант осуществления процесса получения азидо-модифицированного антитела.

**[028]** На **фиг.5** представлена схема, демонстрирующая вариант осуществления процесса получения конъюгата антитело-лекарственное средство, где азидо-

модифицированное антитело конъюгировано с частью линкер-лекарственное средство, содержащей напряженную циклоалкинильную группу.

[029] На **фиг.6** представлен график, демонстрирующий модифицированное антитело.

[030] На **фиг.7** представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность конъюгатов B7-H4\_2F9 с цитотоксическим лекарственным средством: конъюгат **9-1** (2,46/0,075 или 4,92/0,150 мг/кг), конъюгат **11** (2,28/0,075 или 4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **3** (2,30/0,075 или 4,60/0,150 мг/кг), конъюгат **6** (2,30/0,075 или 4,61/0,150 мг/кг), конъюгат **7** (2,30/0,075 или 4,60/0,150 мг/кг) и конъюгат **1-1** (2,30/0,075 или 4,60/0,150 мг/кг) (все дозы приведены для антитела/груза) в модели с ксенотрансплантатом на мышах MX-1 TNBC.

[031] На **фиг.8** представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность конъюгатов B7-H4\_2F9 B7-H4\_2F9 с цитотоксическим лекарственным средством: конъюгат **14** (2,57/0,150 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **10** (14,37/0,150 мг/кг), конъюгат **12** (2,26/0,150 или 0,75/0,050 мг/кг), конъюгат **1-2** (5,37/0,177, 2,33/0,077 или 1,79/0,059 мг/кг), конъюгат **2-1** (13,45/0,150, 4,60/0,050 или 2,30/0,025 мг/кг) и ХМТ-1604 B7-H4\_2F9V18 (13,80/0 мг/кг) (все дозы приведены для антитела/груза) в модели на мышах с ксенотрансплантатом MX-1 TNBC.

[032] На **фиг.9** представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность конъюгатов B7-H4\_2F9 B7-H4\_2F9 с цитотоксическим лекарственным средством: конъюгат **1-2** (1,79/0,059 или 5,37/0,177 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **2-1** (4,60/0,050 или 13,45/0,150 мг/кг) и конъюгат **10** (14,37/0,150 мг/кг) (все дозы приведены для антитела/груза) в модели с происходящим из пациента ксенотрансплантатом HBCx-19.

[033] На **фиг.10** представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность конъюгатов B7-H4\_2F9 B7-H4\_2F9 с цитотоксическим лекарственным средством: конъюгат **14** (2,57/0,150 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **10** (14,37/ 0,150 мг/кг), конъюгат **12** (2,26/0,150 или 0,75/0,050 мг/кг), конъюгат **1-2** (4,56/0,150, 2,30/0,076 или 1,52/0,05 мг/кг), конъюгат **2-1** (13,45/0,150, 4,60/0,050 или 2,30/0,025 мг/кг) и ХМТ-1604 (13,80/0 мг/кг) (все дозы приведены для антитела/груза) в модели с происходящим из пациента ксенотрансплантатом HBCx-19.

[034] На **фиг.11** представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность конъюгатов B7-H4\_2F9 с лекарственным средством-агонистом STING: конъюгат **17** (0,085/0,030 или 2,84/0,100 мг /кг), конъюгат **16**(0,89/0,030 или 2,97/0,100 мг/кг), конъюгат **15** (0,85/0,030 или 2,83/0,100 мг/кг) и diABZI IV агонист STING (5 мг/кг) (все дозы приведены для антитела/груза) в модели на мышах с ксенотрансплантатом MX-1.

[035] На **фиг.12** представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность конъюгатов B7-H4\_2F9 с лекарственным средством-агонистом STING: конъюгат **14** (2,57/0,150 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **12** (2,26/0,150 или 1,13/0,075 мг/кг), конъюгат **1-3** (4,68/0,150 или 2,34/0,075 мг/кг) и конъюгат **2-2** (13,81/0,150

или 6,90/0,075 мг/кг) (все дозы приведены для антитела/груза) в модели с ксенотрансплантатом MX-1 TNBC.

[036] На **фиг.13** представлена эффективность конъюгата **1-3**, упорядоченная по медианному наилучшему ответу (MBR) с разделением по статусу рецептора для не подвергнутой отбору серии моделей с ксенотрансплантатами происходящего из пациента TNBC и ER-положительного рака молочной железы. По оси Y представлен MBR, достигнутый каждой моделью, и по оси X идентифицирован ID модели.

[037] На **фиг.14** представлена экспрессия белка в подгруппе моделей с ксенотрансплантатами происходящего из пациента TNBC- и ER-положительного рака молочной железы из примера 44 при оценке по показателю TPS.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[038] Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связывают B7-H4 человека в растворимой форме или в связанной с мембраной форме (т.е. при экспрессии на клеточной поверхности). Кроме того, изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связывают B7-H4. Эти антитела в совокупности обозначают в настоящем описании как "антитела против B7-H4".

#### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[039] Химические наименования, приведенные для промежуточных соединений и/или соединений по настоящему изобретению, описанных в настоящем описании, могут относиться к любому из таутомерных представлений таких соединений (в некоторых случаях такие альтернативные наименования приведены в экспериментальной части). Следует понимать, что любая отсылка к названному соединению (промежуточному соединению или соединению по изобретению) или структурно изображенному соединению (промежуточному соединению или соединению по изобретению) предполагает охват всех таутомерных форм, включая цвиттерионные формы таких соединений, и любых их смесей.

[040] Следует понимать, что термины "в некоторых вариантах осуществления", "в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения" и "в некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению" могут использоваться взаимозаменяемо, когда это целесообразно.

[041] Термин "приблизительно", "примерно" или "примерный", когда его используют применительно к числовой величине, означает, что включен набор или диапазон величин. В некоторых вариантах осуществления "приблизительно X" включает диапазон величин, которые находятся в пределах  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 2\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$ ,  $\pm 0,2\%$  или  $\pm 0,1\%$  от X, где X представляет собой числовую величину. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону величин, которые на 5% больше или менее указанной величины. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону величин, которые на 2% больше или меньше указанной величины. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону величин, которые на 1% больше или меньше указанной величины.

**[042]** Указание диапазонов величин предназначено только для того, чтобы они служили в качестве сокращенного способа указания индивидуально каждой отдельной величины, входящей в данный диапазон, если в настоящем описании нет иных указаний, и каждая отдельная величина включена в описание, как если она была индивидуально указана в настоящем описании. Диапазон, используемый в настоящем описании, если нет иных указаний, включает два предела диапазона. В некоторых вариантах осуществления оба из выражений "x представляет собой целое число между 1 и 6" и "x представляет собой целое число от 1 до 6" означают "x представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6", т.е. термины "между X и Y" и "диапазон от X до Y, включают X и Y и целые числа между ними.

**[043]** Как используют в соответствии с настоящим изобретением, следует понимать, что следующие термины, если нет иных указаний, имеют приведенные ниже значения.

**[044]** Как используют в рамках изобретения, термины "антитело против B7-H4", "антитело к B7-H4" и "антитело, которое связывается с B7-H4," относятся к антителу, которое способно связывать B7-H4 с достаточной аффинностью, чтобы такое антитело было пригодным в качестве диагностического и/или терапевтического средства при нацеливании на B7-H4.

**[045]** Термин "B7-H4", как используют в рамках изобретения, относится к любому нативному зрелому B7-H4, который является результатом процессинга белка-предшественника B7-H4 в клетке. Термин включает B7-H4 из любого являющегося источником позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди и яванские макаки) и грызуны (например, мыши и крысы), если нет иных указаний. Также термин включает встречающиеся в природе варианты B7-H4, например, сплайс-варианты или аллельные варианты.

**[046]** Термин "положительная по B7-H4 злокачественная опухоль" относится к злокачественной опухоли, содержащей клетки, которые экспрессируют B7-H4 на их поверхности. В некоторых вариантах осуществления экспрессию B7-H4 на клеточной поверхности определяют, например, с использованием антител к B7-H4, в способе, таком как иммуногистохимия, FACS и т.д.

**[047]** Альтернативно считается, что экспрессия мРНК B7-H4 коррелирует с экспрессией B7-H4 на клеточной поверхности, и она может быть определена способом, выбранным из гибридизации *in situ* и ОТ-ПЦР (включая количественную ОТ-ПЦР).

**[048]** Термин "B7-H4-положительная клетка" относится к клетке, которая экспрессирует B7-H4 на ее поверхности.

**[049]** Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, используют в наиболее широком значении, и он охватывает различные антительные структуры, включая, но не ограничиваясь ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител при условии, что они демонстрируют желаемую активность связывания антигена. В данной области известны разные способы нумерации аминокислотных последовательностей антител и идентификации определяющих комплементарность

областей, например, система нумерации Kabat (См. Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health и Human Services, US Government Printing Office (1991)) или система нумерации IMGT (см. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®. Доступна через интернет: <http://www.imgt.org/>). Система нумерации IMGT широко используется и признана в качестве надежной и точной системы в данной области для определения положений аминокислот в кодирующих последовательностях, выравнивания аллелей и легкого сравнения последовательностей иммуноглобулинов (IG) и Т-клеточных рецепторов (TR) из всех видов позвоночных. Точность и стабильность данных IMGT основаны на IMGT-ONTOLOGY - первой и на настоящий момент уникальной онтологии для иммуногенетики и иммуноинформатики (см. Lefranc. M.P. *et al.*, Biomolecules, 2014 Dec; 4(4), 1102-1139). Инструменты и базы данных IMGT осуществляют прогон против справочных директорий IMGT, сконструированных из большого репозитория последовательностей. В системе IMGT V-ДОМЕН IG и C-ДОМЕН IG разграничиваются с учетом границ экзонов, когда это является пригодным. Таким образом, с учетом доступности большого количества последовательностей для базы данных IMGT, система нумерации экзонов IMGT может надежно использоваться и "используются" специалистами в данной области для определения положений аминокислот в кодирующих последовательностях и для выравнивания аллелей. Кроме того, сопоставления между уникальной нумерацией IMGT с другими нумерациями (т.е. Kabat) доступны в IMGT Scientific chart (См. Lefranc. M.P. *et al.*, Biomolecules, 2014 Dec; 4(4), 1102-1139).

**[050]** Термин "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела и которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими: Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

**[051]** Термин "антитело, которое связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело, как используют в рамках изобретения, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и, напротив, эталонное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Иллюстративный конкурентный анализ описан в настоящем описании.

**[052]** Термин "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, которые входят в состав его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам иммуноглобулинов, называют  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.

**[053]** Термин "моноклональные антитело", как используют в рамках изобретения,

относится к антителу, полученному из совокупности по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или появившихся в ходе продуцирования препарата моноклональных антител, причем такие варианты обычно присутствуют в малых количествах. В противоположность препаратам моноклональных антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение "моноклональное" указывает на свойство антитела, состоящее в том, что оно получено из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены разными способами, включая, но не ограничиваясь ими, способ гибридом, способы рекомбинантных ДНК, способы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, содержащих все или часть локусов иммуноглобулинов человека, причем такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описаны в настоящем описании.

**[054]** Термин "голое антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичной частью (например, цитотоксической частью или частью лекарственного средства-агониста STING). Голое антитело может присутствовать в фармацевтическом составе.

**[055]** Термин "нативные антитела" относится к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные IgG-антитела представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые связаны дисульфидной связью. От N- к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), также называемую переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично, от N- к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), также называемую переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL). Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), исходя из аминокислотной последовательности ее константного домена.

**[056]** "Выделенное антитело" представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищено до чистоты более 95% или 99% при определении, например, электрофоретическим способом (например, SDS-PAGE, изоэлектрическое фокусирование (IEF), капиллярный электрофорез) или хроматографическим способом (например, ионообменная или обращенно-фазовая ВЭЖХ). Для обзора способов оценки чистоты антител см., например,

Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

**[057]** Термин "эпитоп" относится к конкретной области на молекуле антигена, с которой связывается антитело.

**[058]** Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, которое происходит из не являющегося человеческим антитела (например, мыши), и которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства родительского антитела, но является менее иммуногенным у человека. Подразумевается, что гуманизированные, как используют в рамках изобретения, включают деиммунизированные антитела.

**[059]** Термин "гуманизированная форма" антитела, например, не являющегося человеческим антитела, относится к антителу, которое было подвергнуто гуманизации.

**[060]** Термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с", как используют в настоящем описании в контексте двух или более антител, указывает на то, что два или более антител конкурируют за связывание с B7-N4, например, конкурируют за связывание B7-N4. Антитело "блокирует" или "перекрестно блокирует" связывание одного или нескольких других антител с B7-N4, если антитело конкурирует с одним или несколькими антителами на 25% или более, причем 25%-74% соответствуют "частичному блокированию" и 75%-400% соответствуют "полному блокированию". Если не определено иначе или если контекст этому не противоречит, термины "конкурирует с", "перекрестно конкурирует с", "блокирует" или "перекрестно блокирует", когда их используют в настоящем описании, также предполагает охват таких пар антител.

**[061]** Как используют в рамках изобретения, подразумевается, что антитело, которое "специфически связывается с B7-N4 человека", относится к антителу, которое связывается с B7-N4 человека с  $K_D$   $1 \times 10^{-7}$  или менее, более конкретно  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, более конкретно  $3 \times 10^{-8}$  М или менее, более конкретно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, еще более конкретно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее.

**[062]** Термин "по существу не связывается с" белком или клетками, как используют в рамках изобретения, означает "не связывается с" или "не связывается с высокой аффинностью с" белком или клетками, т.е. связывается с белком или клетками с  $K_D$   $1 \times 10^{-8}$  М или более, более предпочтительно  $1 \times 10^{-5}$  М или более, более предпочтительно  $1 \times 10^{-4}$  М или более, более предпочтительно  $1 \times 10^{-3}$  М или более, еще более предпочтительно  $1 \times 10^{-2}$  М или более.

**[063]** Термины "цитотоксические средства" или "цитотоксическая лекарственная часть" относятся к соединениям, которые вызывают клеточную смерть, в основном путем препятствования непосредственно функционированию клетки или ингибирования или препятствования мейозу клеток, включая, но не ограничиваясь ими, алкилирующие средства, факторы некроза опухоли, интеркалирующие средства, ингибиторы микротубулина и ингибиторы топоизомеразы.

**[064]** Термин "агонист STING", как используют в рамках изобретения, относится к соединению или части, которые способны взаимодействовать с STING, например,

посредством связывания с STING и/или индукции нижеследующей передачи сигнала (например, характеризующейся активацией молекул, ассоциированных с функцией STING). Это включает прямое фосфорилирование STING, IRF3 и/или NF- $\kappa$ B и также может включать STAT6. В некоторых вариантах осуществления активация каскада STING приводит к повышению продуцирования интерферонов 1 типа (в основном, IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ) и/или экспрессии стимулируемых интерфероном генов.

**[065]** Термин "лекарственная часть-агонист STING", как используют в рамках изобретения, относится к части, происходящей из агониста STING и способной взаимодействовать с STING. В некоторых вариантах осуществления лекарственная часть-агонист STING представляет собой агонист STING, который модифицирован, чтобы позволить соединение данной части с остальной частью конъюгата по настоящему изобретению.

**[066]** Термин "сахар" относится к моносахариду, например, глюкозе (Glc), галактозе (Gal), маннозе (Man) и фукозе (Fuc). Термин "производное сахара" относится к производному моносахарида, т.е. моносахариду, содержащему заместители и/или функциональные группы. Примеры производного сахара включают, но не ограничиваются ими, аминсахара и сахарные кислоты. Примеры производного сахара также включают соединения, обозначаемые как  $S'(F')_{x1}$ , где  $S'$  представляет собой сахар или производное сахара,  $F'$  представляет собой функциональную группу и  $x1$  указывает на количество функциональных групп.

**[067]** Термин "часть корового GlcNAc", как используют в рамках изобретения, относится к моносахаридной, полисахаридной или олигосахаридной части, содержащей GlcNAc (например, коровый GlcNAc), которая соединена с антителом (например, через положение C1 GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления GlcNAc соединен с антителом через N-гликозидную связь атома азота амида в боковой цепи аминокислоты аспарагина антитела. В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc присутствует в нативном участке гликозилирования антитела или внесена в другой участок антитела. В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc представляет собой моносахарид (например, часть корового GlcNAc также является частью конечного GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc дополнительно содержит фукозу, например, часть корового GlcNAc представляет собой дисахаридную часть корового GlcNAc-( $\alpha$ 1-6-Fuc) (которая может упоминаться как GlcNAc(Fuc)). Таким образом, когда антитело содержит часть корового GlcNAc, антитело может содержать моносахаридную или дисахаридную часть корового GlcNAc, и часть корового GlcNAc может дополнительно содержать фукозу (например, дисахаридная часть корового GlcNAc(Fuc)). Если часть корового GlcNAc дополнительно содержит фукозу, фукоза может быть связана через  $\alpha$ -1,6 с O-6 части корового GlcNAc. Часть корового GlcNAc, дополнительно содержащая фукозу, может упоминаться как коровый GlcNAc(Fuc).

**[068]** Термин "коровый GlcNAc" относится к внутреннему GlcNAc, который является частью полисахарида или олигосахида, где полисахарид или олигосахарид



соединен с антителом через внутренний GlcNAc.

**[069]** Термин "часть концевой GlcNAc", как используют в рамках изобретения, относится к части, содержащей GlcNAc, которая соединена с антителом и имеет концевую функциональную группу, доступную для дальнейшей модификации (например, посредством соединения P"-S"-A"). В некоторых вариантах осуществления часть концевой GlcNAc может дополнительно содержать фукозу. В некоторых вариантах осуществления часть концевой GlcNAc образована путем реакции части корового GlcNAc гликопротеина (например, гликана антитела) с эндогликозидазой.

**[070]** Термин "нуклеотид" используют в его обычном научном значении, и он относится к молекуле, которая содержит нуклеиновое основание, сахар из пяти атомов углерода (либо рибозу, либо 2-дезоксирибозу), и одну, две или три фосфатных группы. Без фосфатной группы нуклеиновое основание и сахар составляют нуклеозид. Нуклеотид, таким образом, также может упоминаться как нуклеозидмонофосфат, нуклеозиддифосфат или нуклеозидтрифосфат. Нуклеиновое основание может представлять собой аденин, гуанин, цитозин, урацил или тимин.

**[071]** Термин "белок" используют в его обычном научном значении, и он включает полипептиды, содержащие приблизительно 10 или более аминокислот. Белок может содержать природные или неприродные аминокислоты.

**[072]** Термин "гликопротеин" используют в настоящем описании в его обычном научном значении, и он относится к белку, содержащему одну или несколько моносакхаридных или олигосакхаридных цепей ("гликанов"), ковалентно связанных с белком. Гликан может быть соединен с гидроксильной группой на белке (О-связанный гликан), с амидной функциональной группой на белке (N-гликопротеин) или с углеродом на белке (С-гликопротеин). Гликопротеин может содержать более одного гликана, может содержать комбинацию одного или нескольких моносакхаридных и одного или нескольких олигосакхаридных гликанов, и может содержать комбинацию N-связанных, О-связанных и С-связанных гликанов. Согласно оценке, более 50% всех белков имеют какую-либо форму гликозилирования и, таким образом, считаются гликопротеином.

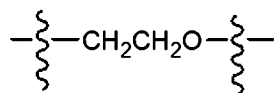
**[073]** Термин "гликан" используют в настоящем описании в его обычном научном значении, и он относится к моносакхаридной или олигосакхаридной цепи, которая соединена с белком. Таким образом, гликан относится к углеводной части гликопротеина. Гликан соединен с белком через углерод С-1 одного сахара, который может быть без дополнительного замещения (моносакхарид) или может быть дополнительно замещен по одной или несколькими его гидроксильными группами (олигосакхарид). Встречающийся в природе гликан, как правило, содержит от 1 до приблизительно 10 сахаридных частей. Однако, когда более длинная сахаридная цепь соединена с белком, указанная сахаридная часть также считается гликаном. Гликан гликопротеина может представлять собой моносакхарид. Гликан также может представлять собой олигосакхарид. Олигосакхаридная цепь гликопротеина может быть линейной или разветвленной. В одном олигосахариде сахар, который прямо соединен с белком, называют коровым сахаром. В одном

олигосахариде сахар, который не прямо соединен с белком и соединен по меньшей мере с двумя другими сахарами, называют внутренним сахаром. В одном олигосахариде сахар, который не прямо соединен с белком, но с одним другим сахаром, т.е. не содержит дополнительных сахарных заместителей на одной или нескольких его гидроксильных группах, называют концевым сахаром. Во избежание сомнений в олигосахариде гликопротеина может существовать множество концевых сахаров, но только один коровый сахар. Гликан может представлять собой О-связанный гликан, N-связанный гликан или С-связанный гликан. В С-связанном гликане моносахаридный или олигосахаридный гликан соединен с атомом С в аминокислоте белка.

[074] Термин "гликозилтрансфераза" относится к суперсемейству ферментов, которые вовлечены в синтез комплексных углеводов, присутствующих на гликопротеинах и гликолипидах.

[075] Термин "N-ацетилгалактозаминилтрансфераза" (GalNAc-T) представляет собой фермент N-ацетил-D-галактозаминилтрансферазу, который катализирует присоединение N-ацетил-D-галактозамина к белкам.

[076] Термин "элемент ПЭГ", как используют в настоящем описании, относится к



субэлементу полиэтиленгликоля, имеющему формулу  $\begin{array}{c} \text{---} \zeta \text{---} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{O---} \zeta \text{---} \\ \text{---} \zeta \text{---} \end{array}$ . В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ включает множество субэлементов ПЭГ.

[077] Термин "алкил", как используют в рамках изобретения, означает насыщенную прямую или разветвленную углеводородную группу, имеющую указанное количество атомов углерода. Термин "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил" или "C<sub>1-6</sub> алкил" относится к метильной части или прямой или разветвленной алкильной части, содержащей от 2 до 6 атомов углерода.

[078] Иллюстративные алкилы включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *втор*-бутил, *трет*-бутил, пентил и гексил.

[079] Термин "галоген(алкил)", как используют в рамках изобретения, означает насыщенную прямую или разветвленную углеводородную группу, имеющую определенное количество (n) атомов углерода и один или несколько (вплоть до 2n+1) атомов галогена. Примеры групп "галоген(C<sub>1-4</sub> алкила)" включают, но не ограничиваются ими, -CF<sub>3</sub> (трифторметил), -CCl<sub>3</sub> (трихлорметил), 1,1-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил и гексафторизопропил.

[080] Термин "алкенил", как используют в рамках изобретения, относится к прямой или разветвленной углеводородной группе, имеющей указанное количество атомов углерода и по меньшей мере 1 и вплоть до 3 углерод-углеродных двойных связей. Примеры включают этенил и пропенил.

[081] Термин "алкинил", как используют в рамках изобретения, относится к прямой или разветвленной углеводородной группе, имеющей указанное количество атомов углерода и по меньшей мере 1 и вплоть до 3 углерод-углеродных тройных связей. Примеры включают этинил и пропинил.

**[082]** Термин "алкокси-" или "(алкил)окси-", как используют в рамках изобретения, относится к группе "алкилокси", содержащей алкильную часть, имеющую указанное количество атомов углерода, присоединенную через соединительный атом кислорода. Иллюстративные группы "C<sub>1-4</sub> алкокси-" или "(C<sub>1-4</sub> алкил)окси-" включают, но не ограничиваются ими, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, *n*-бутокси, *втор*-бутокси и *трет*-бутокси.

**[083]** Термин "галоген(алкокси)-", как используют в рамках изобретения, означает насыщенную прямую или разветвленную углеводородную группу, имеющую указанное количество (*n*) атомов углерода и один или несколько (вплоть до 2*n*+1) атомов галогена, присоединенную через соединительный атом кислорода. Иллюстративные группы "галоген(C<sub>1-4</sub> алкокси)-" включают, но не ограничиваются ими, -OCHF<sub>2</sub> (дифторметокси), -OCF<sub>3</sub> (трифторметокси), -OCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (трифторэтокси) и -OCH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (гексафторизопропокси).

**[084]** Термин "амино", как используют в рамках изобретения, относится к заместителю, содержащему по меньшей мере один атом азота. В частности, в термин "амино" включены заместители: -NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1-4</sub> алкил), алкиламино, или (C<sub>1-4</sub> алкил)амино- или (C<sub>1-4</sub> алкил)(C<sub>1-4</sub> алкил)амино- или диалкиламино, амид-, карбамид-, мочевины и сульфамид.

**[085]** Термин "карбоциклическая группа или часть", как используют в рамках изобретения, относится к циклической группе или части, в которой члены кольца являются атомами углерода, которые могут быть насыщенными, частично ненасыщенными (неароматическими) или полностью ненасыщенными (ароматическими).

**[086]** Термин "циклоалкил", как используют в рамках изобретения, относится к неароматической, насыщенной углеводородной кольцевой группе, содержащей указанное количество атомов углерода в кольце. Например, термин "C<sub>3-6</sub> циклоалкил" относится к циклической группе, имеющей от трех до шести атомов углерода в конце. Иллюстративные "C<sub>3-6</sub> циклоалкильные" группы включают циклопропил, циклобутил, цикlopентил и циклогексил.

**[087]** Термин "арил", как используют в рамках изобретения, относится к группе, обладающей ароматичностью, включая "конъюгированные" или полициклические системы с одним или несколькими ароматическими кольцами, которые не содержат никакого гетероатома в структуре кольца. Термин "арил" включает как одновалентные формы, так и двухвалентные формы. Примеры арильных групп включают, но не ограничиваются ими, фенил, бифенил, нафтил и т.п. В некоторых вариантах осуществления арил представляет собой фенил.

**[088]** Термин "гетероциклическая группа или часть", как используют в рамках изобретения, относится к циклической группе или части, имеющей в качестве членов кольца атомы по меньшей мере двух разных элементов, причем циклическая группа или часть может быть насыщенной, частично ненасыщенной (неароматической) или полностью ненасыщенной (ароматической).

**[089]** Термин "гетероатом", как используют в рамках изобретения, относится к атому

азота, серы или кислорода, например, к атому азота или атому кислорода.

**[090]** Термин "гетероциклоалкил", как используют в рамках изобретения, относится к неароматической, моноциклической или бициклической группе, содержащей 3-10 атомов кольца и содержащей один или несколько (обычно один или два) гетероатомных членов кольца, независимо выбранных из кислорода, серы и азота. Точка присоединения гетероциклоалкильной группы может представлять собой любой подходящий атом углерода или азота.

**[091]** Термин "гетероарил", как используют в рамках изобретения, относится к ароматической моноциклической или бициклической группе, содержащей 5-10 атомов кольца, включающей 1-4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, где по меньшей мере часть группы является ароматической. Например, этот термин охватывает бициклические гетероциклические-арильные группы, содержащие либо фенильное кольцо, конденсированное с гетероциклической частью, либо гетероарильную кольцевую часть, конденсированную с карбоциклической частью. Точка присоединения гетероарильной группы может представлять собой любой подходящий атом углерода или азота.

**[092]** Термины "галоген" и "гало", как используют в рамках изобретения, относится к галоген-радикалу, например, заместителю: фтор, хлор, бром или йод.

**[093]** Термин "оксо", как используют в рамках изобретения, относится к присоединенной через двойную связь кислородной части; например, если она присоединена непосредственно к атому углерода, они образуют карбонильную часть ( $C=O$ ).

**[094]** Подразумевается, что термин "гидрокси" или "гидроксил", как используют в рамках изобретения, означает радикал  $-OH$ .

**[095]** Термин "циано", как используют в рамках изобретения, относится к нитрильной группе,  $-C\equiv N$ .

**[096]** Термин "необязательно замещенный", как используют в рамках изобретения, указывает на то, что группа (такая как алкильная, циклоалкильная, алкокси, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа), или кольцо, или часть могут быть незамещенными, или группа, кольцо или часть могут быть замещены одним или несколькими заместителем(ями). В случае, когда группы могут быть выбраны из ряда альтернативных групп, выбранные группы могут быть одинаковыми или могут различаться. Подходящие заместители могут включать, например, алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонато, фосфинато, amino (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонато, сульфоамил,

сульфонамидо, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероциклил, алкиларил, или ароматическую или гетероароматическую часть.

[097] Термин "независимо", как используют в рамках изобретения, означает, что более одного заместителя выбрано из ряда возможных заместителей, причем эти заместители могут быть одинаковыми или могут различаться.

[098] Термин "фармацевтически приемлемый", как используют в рамках изобретения, относится к соединениям, конъюгатам, материалам, композициям и дозированным формам, которые по мнению медицинского специалиста являются пригодными для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения или другой проблемы или осложнения, с приемлемым соотношением польза/риск.

[099] Как используют в рамках изобретения, термин "лечение" или "лечить" описывает контроль и уход за пациентом для борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением, и он включает введение соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, полиморфа или сольвата для облегчения симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения, или для устранения заболевания, состояния или нарушения. Термин "лечить" также может включать обработку клетки *in vitro* или в модели на животных.

[100] Как используют в рамках изобретения, термин "предупреждение", "предупреждать" или "защита против" описывает снижение или устранение появления симптомов или осложнений такого заболевания, состояния или нарушения.

[101] Термин "индивидуум" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, наиболее предпочтительно человеку, которое является объектом лечения, наблюдения или эксперимента.

[102] Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного соединения или фармацевтического средства, включая конъюгат по изобретению, которое индуцирует биологический или медицинский ответ в системе тканей, у животного или у человека, которого хочет достичь исследователь, ветеринар, медицинский врач или другой клиницист, который включает облегчение или частичное облегчение симптомов заболевания, синдрома, состояния или нарушения, подвергаемого лечению.

[103] Терапевтически "эффективное количество" означает количество конъюгата, которое при введении пациенту, нуждающемуся в таком лечении, является достаточным для эффективного лечения или предупреждения, как определено в настоящем описании. Количество данного конъюгата, которое соответствует такому количеству, варьируется в зависимости от таких факторов, как конкретный конъюгат (например, активность ( $pIC_{50}$ ), эффективность ( $EC_{50}$ ) и биологическое время полужизни конкретного конъюгата), заболевание и его тяжесть, параметры (например, возраст, размер и масса тела) пациента, нуждающегося в лечении, но, тем не менее, может быть определено специалистом в данной области стандартными способами. Аналогично, длительность лечения и периода времени

введения (период времени между дозировками и расписание дозировок, например, до/с/после приема пищи) конъюгата варьируется в зависимости от параметров млекопитающего, нуждающегося в лечении (например, масса тела), конкретного конъюгата и его свойств (например, фармакокинетических свойств), заболевания или нарушения и их тяжести и конкретной используемой композиции и способа, но, тем не менее, может быть определена специалистом в данной области.

**[104]** Термин "композиция" относится к продукту, который включает определенные ингредиенты в терапевтически эффективных количествах, а также к любому продукту, который является результатом, прямо или непрямо, комбинации определенных ингредиентов в определенных количествах.

**[105]** Как используют в рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" означает эксципиент, который является пригодным для получения фармацевтической композиции, который является в основном безопасным, нетоксичным, и не является нежелательным ни с биологической, ни с иной точки зрения, и включает эксципиент, который является приемлемым для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека. "Фармацевтически приемлемый эксципиент", как используют в описании и формуле изобретения, включает как один, так и более одного такого эксципиента.

**[106]** В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты по изобретению, или их энантиомеры, диастереомеры, сольваты или фармацевтически приемлемые соли, являются пригодными для лечения или смягчения заболеваний, синдромов, состояний или нарушений, таких как меланомы, рак толстого кишечника, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого, фибросаркома и гепатит В.

**[107]** Термины "конъюгат(ы) по изобретению" или "конъюгат(ы) по настоящему изобретению", как используют в рамках изобретения, означают конъюгат, как определено в настоящем описании, в любой форме, т.е. любой таутомерной форме, любой изомерной форме, любой солевой или несолевой форме (например, в его кислотной или основной форме, или в качестве соли, в частности, фармацевтически приемлемой соли) и любой его физической форме (например, включая не являющиеся твердыми формы (например, жидкие или полутвердые формы) и твердые формы (например, аморфные или кристаллические формы, конкретные полиморфные формы, формы сольватов, включая формы гидратов (например, моно-, ди- и гемигидраты)), и смеси различных форм.

**[108]** Таким образом, настоящее изобретение относится к конъюгатам, как описано в настоящем описании, в любой солевой или несолевой форме, любой их физической форме, и различных смешанных формах. В то время как они включены в настоящее изобретение, будет понятно, что конъюгаты по настоящему изобретению в любой солевой или несолевой форме, и в любой их физической форме, могут иметь разные уровни активности, разную биодоступность и разную пригодность к обработке для целей составления.

**[109]** Как используют в рамках изобретения, выражения "один или несколько из А,

В или С", "один или несколько А, В или С", "один или несколько из А, В и С", "один или несколько А, В и С", "выбранный из группы, состоящей из А, В и С", "выбранный из А, В и С" и т.п. используют взаимозаменяемо, и все они относятся к выбору из группы, состоящей из А, В и/или С, т.е. одному или нескольким А, одному или нескольким В, одному или нескольким С, или любой их комбинации, если нет иных указаний.

[110] Понятно, что на протяжении описания, когда композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, предусматривается, что композиции также состоят по существу из или состоят из указанных компонентов. Аналогично, когда способы или процессы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии процесса, процессы также состоят по существу из или состоят из указанных стадий процесса. Кроме того, следует понимать, что порядок стадий или порядок проведения определенных действий является незначительным при условии, что изобретение остается применимым. Более того, две или более стадий или действий можно проводить одновременно.

[111] Все проценты и соотношения, использованные в настоящем описании, если нет иных указаний, приведены по массе. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут понятными из разных примеров. Приведенные примеры иллюстрируют разные компоненты и методологию, используемые при применении настоящего изобретения на практике. Примеры не ограничивают изобретение, приведенное в формуле изобретения. На основе настоящего описания специалист в данной области может идентифицировать и использовать другие компоненты и методологию, пригодные для применения настоящего изобретения на практике.

[112] Все публикации и патентные документы, цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и индивидуально указаны как включенные в настоящее описание в качестве ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предназначено в качестве допущения, что какой-либо из них является соответствующим уровнем техники, а также в качестве какого-либо допущения в отношении их содержимого или даты. После описания изобретения с помощью письменного описания специалистам в данной области будет понятно, что изобретение можно применять на практике в разных вариантах осуществления и что приведенное выше описание и примеры ниже приведены для целей иллюстрации, а не ограничения, формулы изобретения, которая следует далее.

[113] При использовании в настоящем описании в контексте двух или более антител термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" указывает на то, что два или более антител конкурируют за связывание с В7-Н4, например, конкурируют за связывание В7-Н4 в анализе, описанном в Примерах 5 или 8. Антитело "блокирует" или "перекрестно блокирует" связывание одного или нескольких других антител с В7-Н4, если антитело конкурирует с одним или несколькими другими антителами на 25% или более, причем 25%-74% соответствуют "частичному блокированию" и 75%-400% соответствуют "полному блокированию", предпочтительно при определении с использованием анализа Примеров 5

и 8. Для некоторых пар антител конкурирование или блокирование в анализе согласно Примерам 5 или 8 наблюдают только тогда, когда одно антитело нанесено на планшет, а другое используется для конкуренции, но не наоборот. Если не определено иначе или если контекст этому не противоречит, термины "конкурирует с", "перекрестно конкурирует с", "блокирует" или "перекрестно блокирует", когда их используют в настоящем описании, также предусматривают охват таких пар антител.

#### **Конъюгаты и каркасы антитело-лекарственное средство**

[114] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конъюгату антитело против В7-Н4-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело против В7-Н4-лекарственное средство является сайт-специфическим. В некоторых вариантах осуществления конъюгат В7-Н4 антитело-лекарственное средство не является сайт-специфическим. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело против В7-Н4-лекарственное средство является биodeградируемым и биосовместимым, и/или демонстрирует высокую нагрузку лекарственным средством и сильное связывание с антигеном-мишенью.

[115] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело против В7-Н4-лекарственное средство, содержащему нацеливающую на В7-Н4 часть (например, антитело) и одну или несколько частей линкер-лекарственное средство, где нацеливающая часть ковалентно связана с одной или несколькими частями линкер-лекарственное средство.

[116] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая на В7-Н4 часть представляет собой антитело, антитело с встроенным цистеином или модифицированное антитело.

[117] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая на В7-Н4 часть представляет собой антитело против В7-Н4, антитело с встроенным цистеином против В7-Н4 или модифицированное антитело против В7-Н4.

[118] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая на В7-Н4 часть представляет собой антитело против В7-Н4.

[119] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая на В7-Н4 часть представляет собой антитело с встроенным цистеином против В7-Н4.

[120] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая на В7-Н4 часть представляет собой модифицированное антитело против В7-Н4.

[121] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конъюгату антитело против В7-Н4-лекарственное средство, содержащему нацеливающую на В7-Н4 часть (например, антитело) и одну или несколько частей линкер-лекарственное средство, ковалентно связанных с нацеливающей частью, где:

каждая часть линкер-лекарственное средство содержит многофункциональный линкер, который соединяет нацеливающую часть с одним или несколькими лекарственными элементами (например, одно или несколько терапевтических средств (D)) через посредничество высвобождаемого сборочного элемента для каждого лекарственного



элемента, и соединяет гидрофильную группу с лекарственными элементами каждой части линкер-лекарственное средство;

высвобождаемый сборочный элемент способен высвобождать свободное лекарственное средство вблизи целевой области, на которую нацелена нацеливающая часть; и

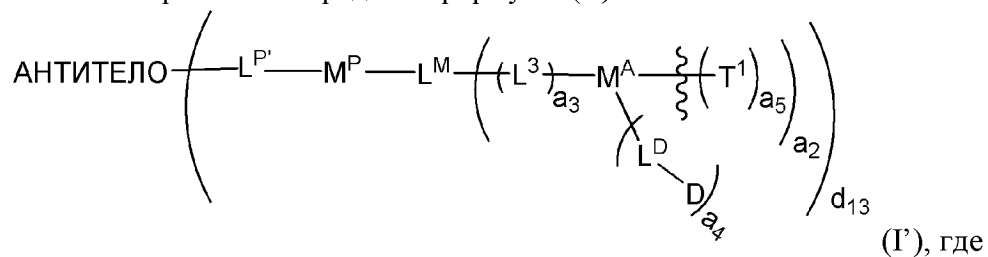
многофункциональный линкер содержит пептидную часть между нацеливающей частью и гидрофильной группой, где пептидная часть содержит по меньшей мере две аминокислоты.

**[122]** В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конъюгату антитело против В7-Н4-лекарственное средство, содержащему нацеливающую на В7-Н4 часть (например, антитело) и одну или несколько частей линкер-лекарственное средство, ковалентно связанных с нацеливающей частью, где:

каждая часть линкер-лекарственное средство содержит многофункциональный линкер, который соединяет нацеливающую на В7-Н4 часть с одним или несколькими лекарственными элементами (например, одно или несколько терапевтических средств (D)) через посредничество высвобождаемого сборочного элемента для каждого лекарственного элемента, и соединяет гидрофильную группу с лекарственными элементами каждой части линкер-лекарственное средство; и

высвобождаемый сборочный элемент способен высвобождать свободное лекарственное средство вблизи целевой области, на которую нацелена нацеливающая часть.

**[123]** В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конъюгату антитело против В7-Н4-лекарственное средство формулы (I'):



$a_2$  представляет собой целое число от 1 до 3;

$a_3$  представляет собой целое число от 0 до 1;

$a_4$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 5;

$a_5$  представляет собой целое число от 1 до 3;

$d_{13}$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 12;

АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4, антитело с встроенным цистеином против В7-Н4 или модифицированное антитело против В7-Н4;

$\text{L}^{\text{P}}$  представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую модифицированное антитело с  $\text{M}^{\text{P}}$ ; где соответствующая одновалентная часть  $\text{L}^{\text{P}}$  содержит функциональную группу  $\text{W}^{\text{P}}$ , которая способна образовывать ковалентную связь с реактивной частью антитела;

$M^P$  представляет собой удлиняющий элемент;

$L^M$  представляет собой связь или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и, когда  $L^M$  представляет собой связь,  $a_2$  равен 1, когда  $L^M$  представляет собой трехвалентный линкер,  $a_2$  равен 2, или, когда  $L^M$  представляет собой четырехвалентный линкер,  $a_2$  равен 3;

$L^3$ , когда он присутствует, представляет собой карбонил-содержащую часть;

$M^A$  содержит пептидную часть, которая содержит по меньшей мере две аминокислоты;

$T^1$  содержит гидрофильную группу и  $\begin{array}{c} \xi \\ \text{---} \end{array}$  между  $T^1$  и  $M^A$  обозначает прямое или не прямое соединение  $T^1$  и  $M^A$ ;

$D$  в каждом случае независимо представляет собой терапевтическое средство, имеющее молекулярную массу  $\leq$  приблизительно 5 кДа; и

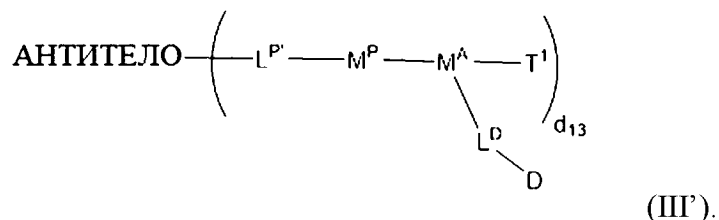
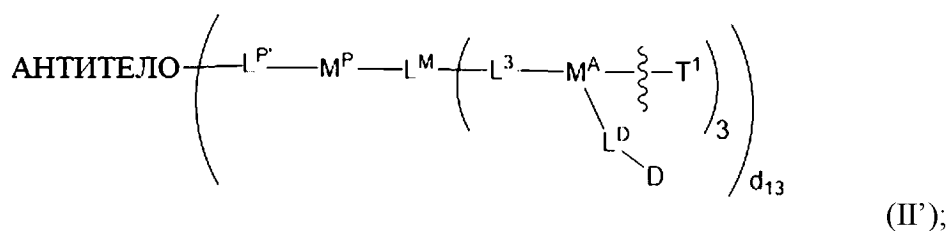
$L^D$  в каждом случае независимо представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую  $D$  с  $M^A$ , и содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь, так что при расщеплении связи  $D$  высвобождается в активной форме для его предполагаемого терапевтического эффекта.

[124] В некоторых вариантах осуществления  $D$  представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства или часть лекарственного средства-агониста STING.

[125] В некоторых вариантах осуществления  $D$  представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства.

[126] В некоторых вариантах осуществления  $D$  представляет собой часть лекарственного средства-агониста STING.

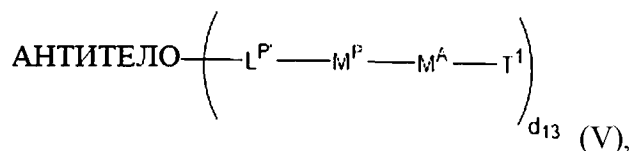
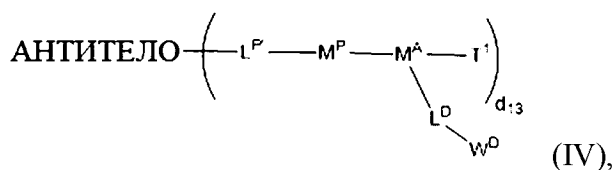
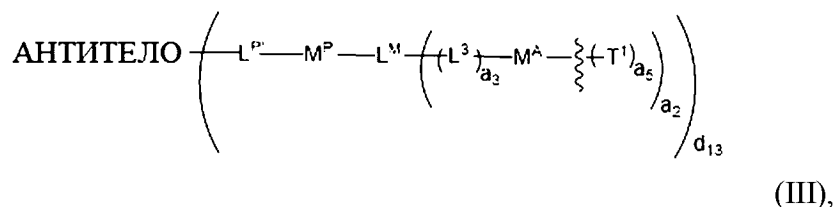
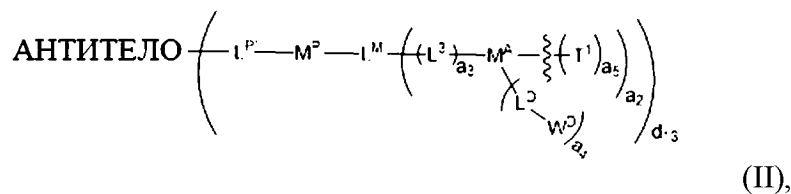
[127] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (II') или (III'):



[128] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к каркасу антитела против B7-H4, содержащему нацеливающую на B7-H4 часть (например, антитело) и одну или несколько линкерных частей, ковалентно связанных с нацеливающей на B7-H4 частью.

[129] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

каркасу антитела против В7-Н4 любой из формул (II)-(V):



где:

$a_2$  представляет собой целое число от 1 до 3;

$a_3$ , когда присутствует, представляет собой целое число от 0 до 1;

$a_4$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 5;

$a_5$  представляет собой целое число от 1 до 3;

$d_{13}$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 12;

АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4, антитело с встроенным цистеином против В7-Н4 или модифицированное антитело против В7-Н4;

$\text{L}^{\text{P}}$  представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую антитело с  $\text{M}^{\text{P}}$ ; где соответствующая одновалентная часть  $\text{L}^{\text{P}}$  содержит функциональную группу  $\text{W}^{\text{P}}$ , которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой антитела;

$\text{M}^{\text{P}}$  представляет собой удлиняющий элемент;

$\text{L}^{\text{M}}$ , когда он присутствует, представляет собой связь или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и, когда  $\text{L}^{\text{M}}$  представляет собой связь,  $a_2$  равен 1, когда  $\text{L}^{\text{M}}$  представляет собой трехвалентный линкер,  $a_2$  равен 2, или, когда  $\text{L}^{\text{M}}$  представляет собой четырехвалентный линкер,  $a_2$  равен 3;

$\text{L}^3$ , когда он присутствует, представляет собой карбонил-содержащую часть;

$\text{M}^{\text{A}}$  содержит пептидную часть, которая содержит по меньшей мере две аминокислоты;

$\text{T}^1$  содержит гидрофильную группу и  $\text{---}\text{---}\text{---}$  между  $\text{T}^1$  и  $\text{M}^{\text{A}}$  означает прямое или

непрямое соединение  $T^1$  и  $M^A$ ;

$W^D$ , когда присутствует, в каждом случае независимо представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой терапевтического средства ("D"), имеющей молекулярную массу  $\leq$  приблизительно 5 кДа; и

$L^D$  в каждом случае независимо представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую  $W^D$  или D с  $M^A$ , и  $L^D$  содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь, так что при разрушении связи D высвобождается в активной форме для его предполагаемого терапевтического эффекта.

**[130]** Конъюгаты и каркасы по изобретению могут включать один или несколько из следующих признаков, когда это применимо.

**[131]** В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  представляет собой целое число от 2 до 12, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4, от 1 до 2, от 4 до 10, от 4 до 8, от 4 до 6, от 6 до 12, от 6 до 10, от 6 до 8, от 8 до 14, от 8 до 12 или от 8 до 10.

**[132]** В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 2 (например,  $d_{13}$  равен 1 или 2). В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 4 (например,  $d_{13}$  равен 2, 3 или 4). В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  представляет собой целое число в диапазоне от 4 до 6 (например,  $d_{13}$  равен 4, 5 или 6). В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  представляет собой целое число в диапазоне от 6 до 8 (например,  $d_{13}$  равен 6, 7 или 8). В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  представляет собой целое число в диапазоне от 6 до 10 (например,  $d_{13}$  равен 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  равен 6. В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  равен 7.

**[133]** В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  равен 8. В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $d_{13}$  равен 2.

**[134]** В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  отсутствует.

**[135]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^3$ , когда он присутствует, независимо представляет собой  $^*-C_{1-12}$  алкил-C(O)- $^{**}$ ,  $^*-NH-C_{1-12}$  алкил-C(O)- $^{**}$  или  $^*-C_{1-12}$  алкил-C(O)-NH- $C_{1-12}$  алкил-C(O)- $^{**}$ , где \* указывает на присоединение к другому  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $L^M$ ; и  $^{**}$  указывает на присоединение к другому  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $M^A$ .

**[136]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$  или представляет собой  $^*-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ , где \* указывает на присоединение к другому  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $L^M$ ; и  $^{**}$  указывает на присоединение к другому  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $M^A$ .

**[137]** В некоторых вариантах осуществления  $a_3$  представляет собой 2 или более, по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-C_{1-12}$  алкил-C(O)- $^{**}$  и по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-NH-C_{1-12}$  алкил-C(O)- $^{**}$ .

**[138]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^3$  представляет собой  $^*-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-**}$  или  $\text{*NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-**}$ , где \* указывает на присоединение к  $\text{L}^{\text{M}}$  и \*\* указывает на присоединение к  $\text{M}^{\text{A}}$ .

[139] В некоторых вариантах осуществления  $a_4$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $a_4$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления  $a_4$  равен 3.

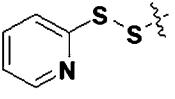
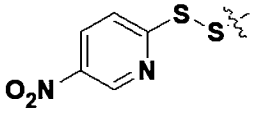
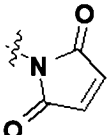
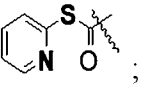
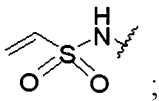
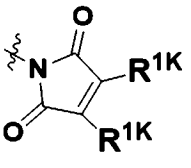
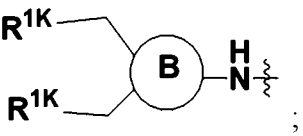
**Вариабельный  $\text{L}^{\text{P}}$  и  $\text{L}^{\text{P'}}$  для конъюгации с антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4**

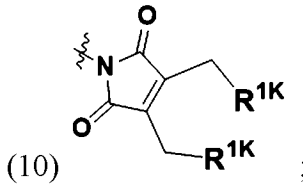
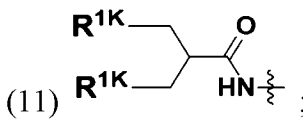
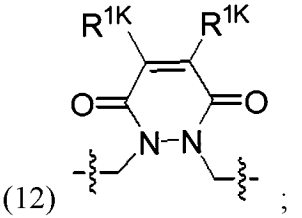
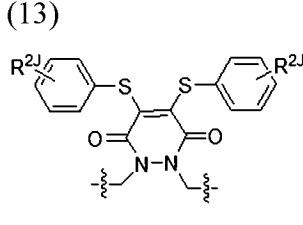
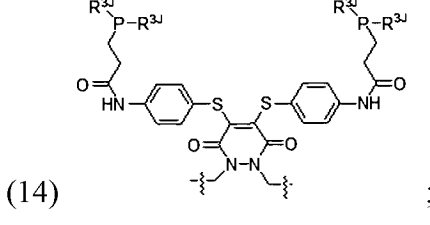
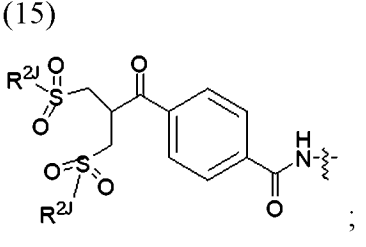
[140] В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P'}}$  представляет собой двухвалентную линкерную часть. В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P'}}$  представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую цистеин антитела против В7-Н4 или антитела с встроенным цистеином против В7-Н4 с  $\text{M}^{\text{P}}$ . В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P'}}$  представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую цистеин антитела против В7-Н4 с  $\text{M}^{\text{P}}$ . В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P'}}$  представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую антитело с встроенным цистеином против В7-Н4 с  $\text{M}^{\text{P}}$ .

[141] В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P}}$  представляет собой соответствующую одновалентную часть. В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P}}$  представляет собой соответствующую одновалентную часть  $\text{L}^{\text{P'}}$ , когда она не соединена с цистеином антитела против В7-Н4 или цистеином антитела с встроенным цистеином против В7-Н4. В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P}}$  представляет собой соответствующую одновалентную часть  $\text{L}^{\text{P'}}$ , когда она не соединена с цистеином антителом против В7-Н4. В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P}}$  представляет собой соответствующую одновалентную часть  $\text{L}^{\text{P'}}$ , когда она не соединена с цистеином антитела с встроенным цистеином против В7-Н4.

[142] В некоторых вариантах осуществления каждый  $\text{L}^{\text{P}}$ , когда он не соединен с цистеином антитела против В7-Н4 или цистеином антитела с встроенным цистеином против В7-Н4, содержит концевую группу  $\text{W}^{\text{P}}$ .

[143] В некоторых вариантах осуществления  $\text{L}^{\text{P}}$  содержит концевую группу  $\text{W}^{\text{P}}$ , в которой каждый  $\text{W}^{\text{P}}$  независимо представляет собой:

|                                                                                           |                                                                                           |                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1)  ; | (2)  ; | (3)  ; |
| (4)  ; | (5)  ; | (6)  ; |
| (7)  ; | (8)  ; | (9)  ; |

|                                                                                             |                                                                                                     |                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br>(10) ; | <br>(11) ;         | <br>(12) ; |
| <br>(13) ; | <br>(14) ;<br>или | <br>(15) ; |

где

кольцо В представляет собой циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил;

$R^{1K}$  представляет собой уходящую группу;

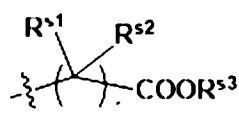
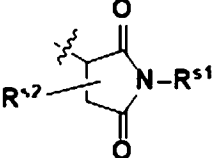
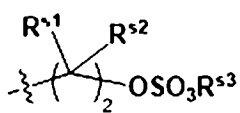
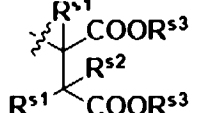
$R^{1A}$  представляет собой защитную группу для серы;

$R^{2J}$  представляет собой водород, алифатическую, арильную, гетероалифатическую или карбоциклическую часть; и

$R^{3J}$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил и каждый из  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  и  $Z_7$  независимо представляет собой атом углерода или азота.

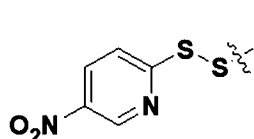
[144] В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{1K}$  представляет собой галоген или  $RC(O)O-$ , где R представляет собой водород, алифатическую, гетероалифатическую, карбоциклическую или гетероциклоалкильную часть.

[145] В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{1A}$  независимо представляет

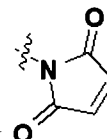
собой  ,  ,  или  , где г

равен 1 или 2 и каждый из  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$  и  $R^{s3}$  независимо представляет собой водород, алифатическую, гетероалифатическую, карбоциклическую или гетероциклоалкильную часть.

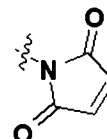
[146] В некоторых вариантах осуществления  $W^P$  представляет собой

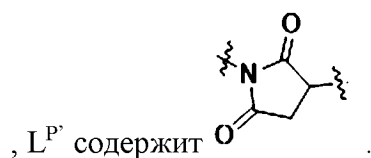


. В некоторых вариантах осуществления  $W^P$  представляет собой



[147] В некоторых вариантах осуществления, когда  $W^P$  представляет собой





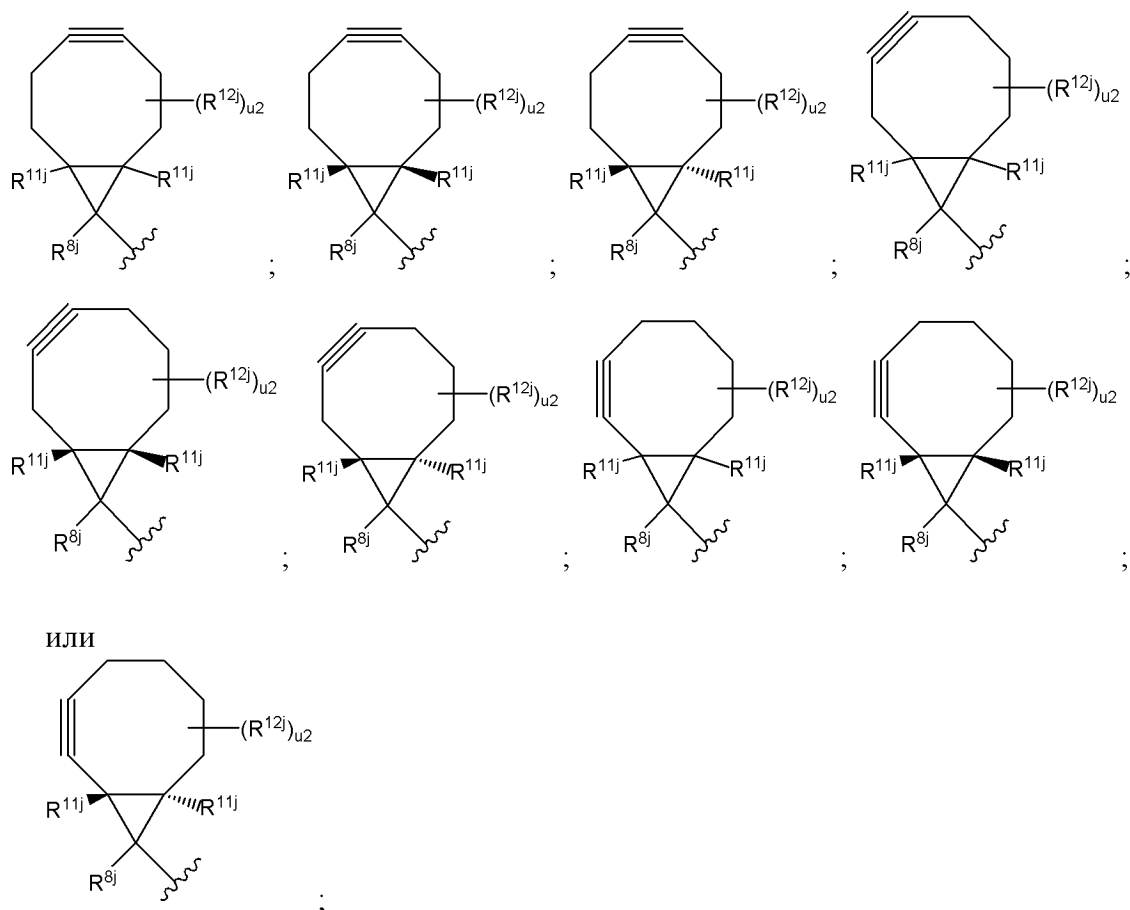
**Вариабельные  $L^P$  и  $L^P$  для конъюгации с модифицированным антителом против В7-Н4**

[148] В некоторых вариантах осуществления  $L^P$  образован путем реакции между функциональной группой (например,  $W^P$ )  $L^P$  и реакционноспособной частью (например, часть модифицированного GlcNAc: \*-GlcNAc-S"-A") модифицированного антитела.

[149] В некоторых вариантах осуществления  $L^P$  содержит триазилил, образованный между функциональной группой (например,  $W^P$ )  $L^P$  и реакционноспособной частью (например, часть модифицированного GlcNAc: \*-GlcNAc-S"-A") модифицированного антитела.

[150] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^P$ , когда он не соединен с модифицированным антителом против В7-Н4, содержит концевую группу  $W^P$ .

[151] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет собой



где

$R^{8j}$  представляет собой водород, галоген,  $C_{1-24}$  алкил (например,  $C_{1-6}$  алкил),  $C_{6-24}$  циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил,  $C_{6-24}$  арил, 6-24-членный гетероарил,  $-(C_{1-24}$  алкил)-( $C_{6-24}$  циклоалкил),  $-(C_{1-24}$  алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил),  $-(C_{1-24}$  алкил)-

(C<sub>6-24</sub> арил) или -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероарил),

где C<sub>1-24</sub> алкил необязательно прерывается одним или несколькими O, N или S, и где C<sub>1-24</sub> алкил (например, C<sub>1-6</sub> алкил), C<sub>6-24</sub> циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-24</sub> арил, 6-24-членный гетероарил, -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> циклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> арил) или -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероарил) необязательно замещен одним или несколькими C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилами, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенилами, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинилами, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> циклоалкилами, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилами), -O(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенилами), -O(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинилами), -O(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> циклоалкилами), галогенами, амино, оксо или силилами,

где C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинил, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> циклоалкил, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил), -O(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкенил), -O(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкинил), -O(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> циклоалкил) необязательно является замещенным, и где C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> циклоалкил, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил) или -O(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> циклоалкил) необязательно прерывается одним или несколькими O, N или S;

R<sup>10j</sup> представляет собой водород, галоген, C<sub>1-24</sub> алкил (например, C<sub>1-6</sub> алкил), C<sub>6-24</sub> циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-24</sub> арил, 6-24-членный гетероарил, -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> циклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> арил) или -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероарил),

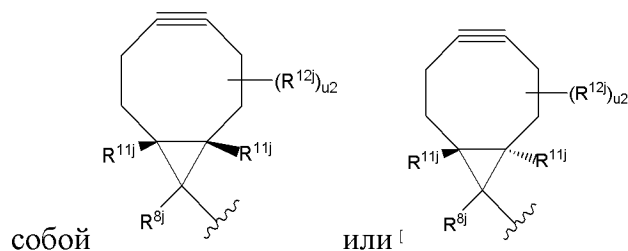
где C<sub>1-24</sub> алкил (например, C<sub>1-6</sub> алкил), C<sub>6-24</sub> циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-24</sub> арил, 6-24-членный гетероарил, -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> циклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> арил), или -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероарил) необязательно является замещенным;

каждый R<sup>11j</sup> независимо представляет собой водород, C<sub>1-24</sub> алкил (например, C<sub>1-6</sub> алкил), C<sub>6-24</sub> циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-24</sub> арил, 6-24-членный гетероарил, -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> циклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> арил) или -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероарил);

каждый R<sup>12j</sup> независимо представляет собой галоген, -OR<sup>10j</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>10j</sup>, C<sub>1-24</sub> алкил (например, C<sub>1-6</sub> алкил), C<sub>6-24</sub> циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-24</sub> арил, 6-24-членный гетероарил, -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> циклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(C<sub>6-24</sub> арил) или -(C<sub>1-24</sub> алкил)-(6-24-членный гетероарил); и

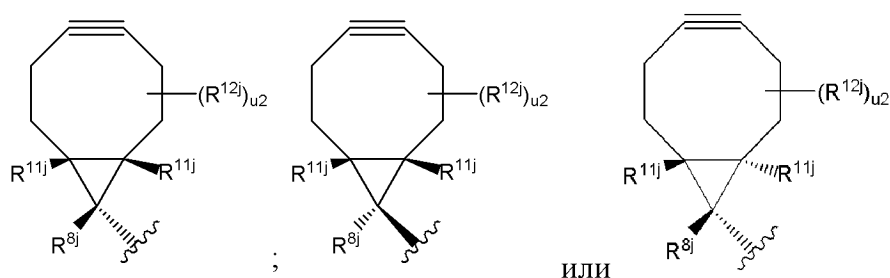
u<sub>2</sub> представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 8.

**[152]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один W<sup>P</sup> представляет



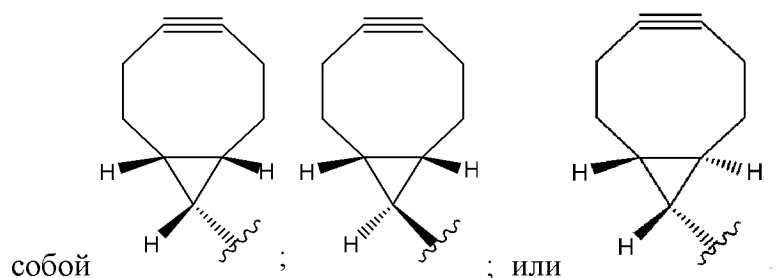
**[153]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один W<sup>P</sup> представляет собой



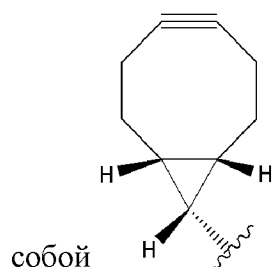


[154] В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{11j}$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $u_2$  равен 0. В некоторых вариантах осуществления  $R^{8j}$  представляет собой водород.

[155] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет

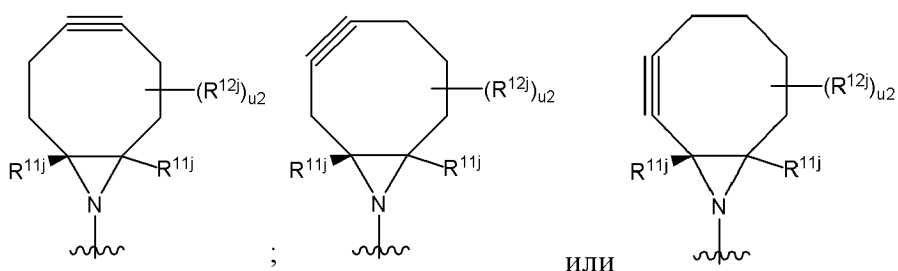


[156] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет

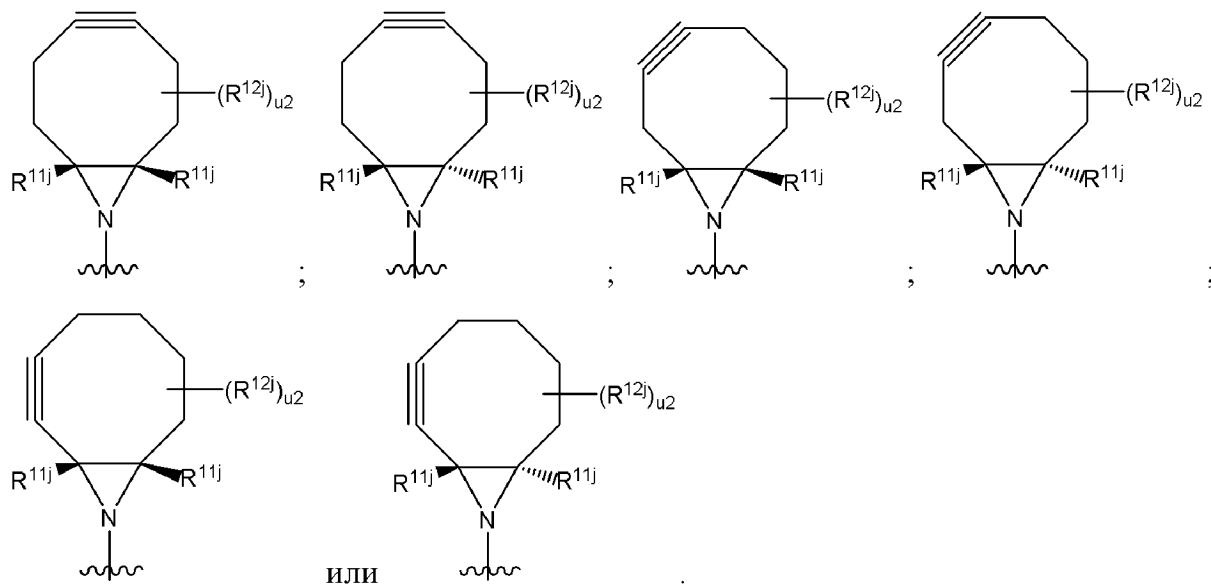


[157] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $R^{12j}$  представляет собой электроноакцепторную группу (например, группу с положительной величиной константы заместителя Гамметта  $\sigma$ ). В некоторых вариантах осуществления подходящие электроноакцепторные группы известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $R^{12j}$  представляет собой галоген (например, F или Cl),  $-OR^{10j}$ ,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $-S(O)_2R^{7j}$ , замещенный  $C_1-C_{12}$  алкил или замещенный  $C_6-C_{12}$  арил, где по меньшей мере один из заместителей представляет собой электроноакцепторную группу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $R^{12j}$  представляет собой фторированный  $C_1-C_{12}$  алкил (например,  $-CF_3$ ), фторированный  $C_5-C_{12}$  арил (например,  $-C_6F_5$ ) или галогеналкилированный  $C_5-C_{12}$  арил (например,  $-[3,5-(CF_3)_2(C_6H_3)]$ ).

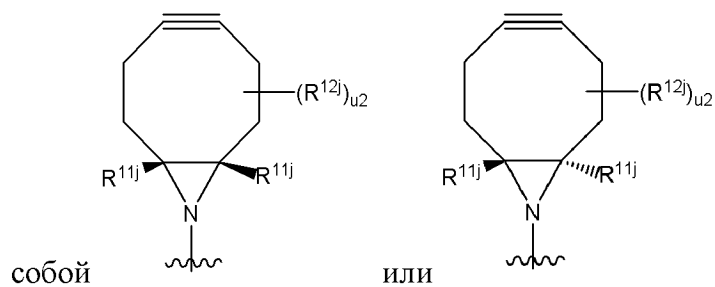
[158] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет собой



[159] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет собой

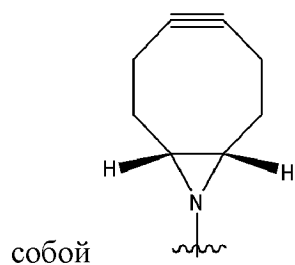


[160] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет

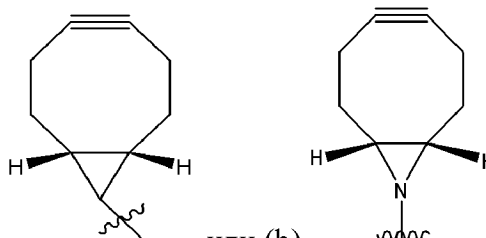


[161] В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{11j}$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $u_2$  равен 0.

[162] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет

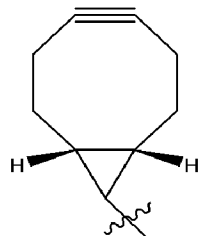


[163] В некоторых вариантах осуществления каждый  $W^P$ , когда он присутствует,



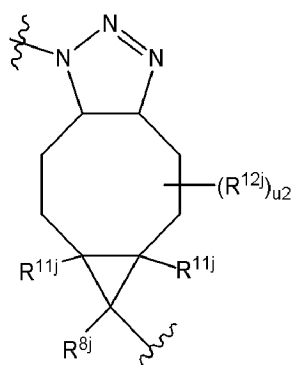
независимо представляет собой: (a) или (b)

[164] В некоторых вариантах осуществления каждый  $W^P$  представляет собой



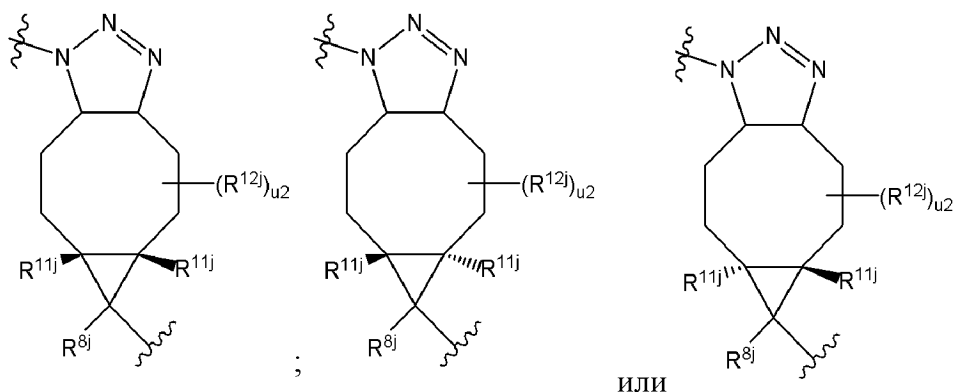
[165] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^P$ , когда он соединен с модифицированным антителом против B7-H4, содержит линкерную группу  $W^P$ .

[166] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$

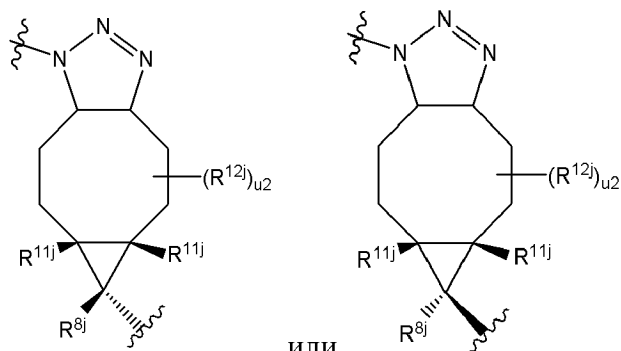


представляет собой

[167] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$  представляет собой



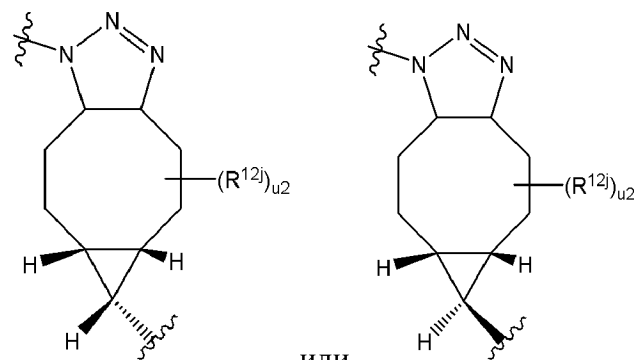
[168] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^P$



представляет собой

или

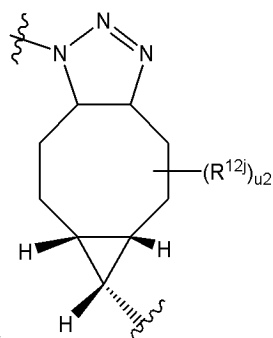
[169] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^{P'}$



представляет собой

или

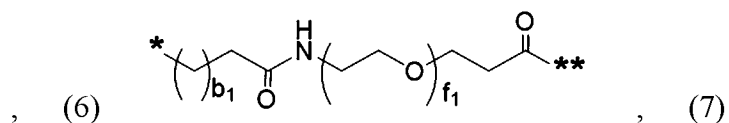
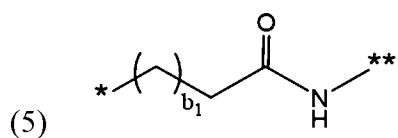
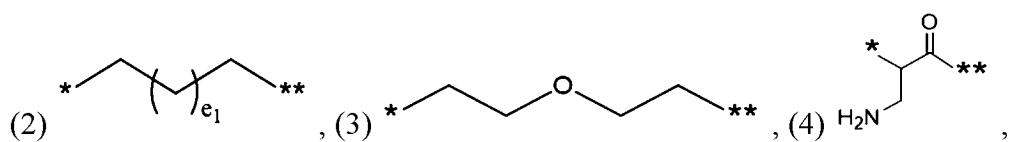
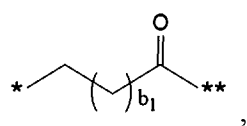
[170] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W^{P'}$



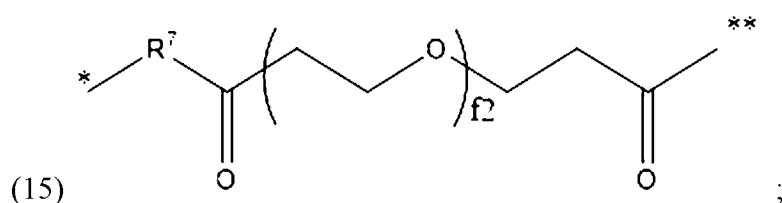
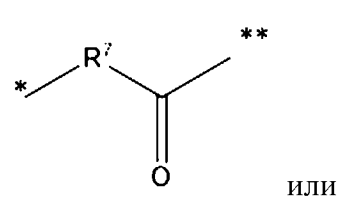
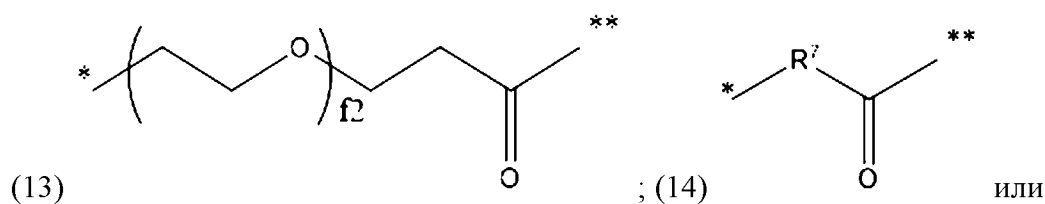
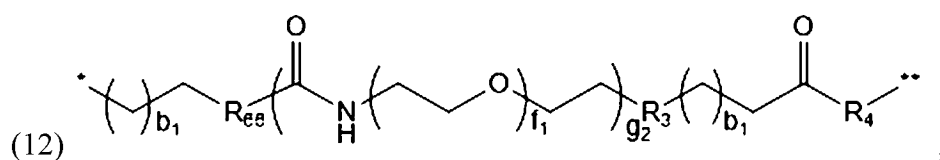
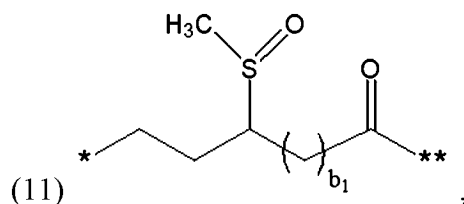
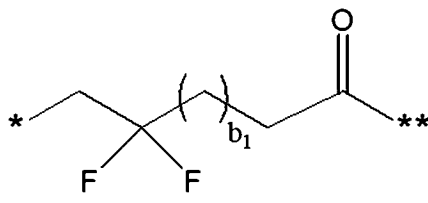
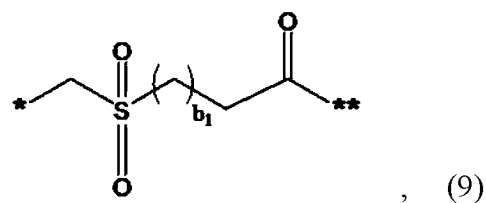
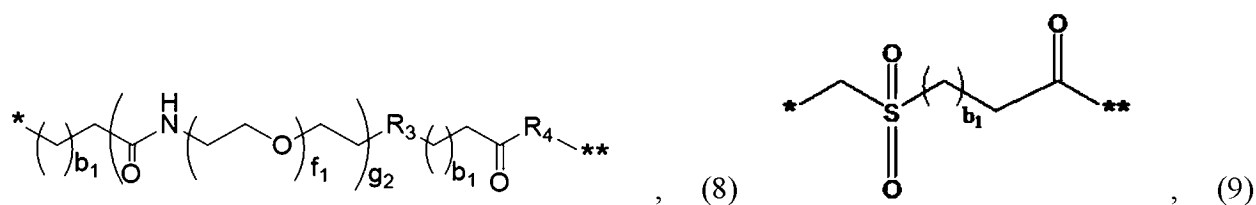
представляет собой

### Удлиняющий элемент $M^P$

[171] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой (1)



(7)



где \* обозначает присоединение к  $L^P$  или  $L^P$  и \*\* обозначает присоединение к  $L^M$  или  $M^A$ ;

каждый  $R_{66}$  независимо представляет собой NH или O;

каждый  $R_3$  независимо представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_5-$  или  $-\text{NR}_5-\text{C}(\text{O})-$ ;

каждый  $R_5$  независимо представляет собой водород,  $\text{C}_{1-6}$  алкил,  $\text{C}_{6-10}$  арил,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил, COOH или  $\text{COO}-\text{C}_{1-6}$  алкил;

$R_4$  представляет собой связь или  $-\text{NR}_5-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})-\text{C}(\text{O})-$ ;

каждый  $R_{20}$  и  $R_{21}$  независимо представляет собой водород,  $\text{C}_{1-6}$  алкил,  $\text{C}_{6-10}$  арил, гидроксированный  $\text{C}_{6-10}$  арил, полигидроксированный  $\text{C}_{6-10}$  арил, 5-12-членный гетероцикл,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил, гидроксированный  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил, полигидроксированный  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил или боковую цепь природной или не природной аминокислоты;

каждый  $R^7$  независимо представляет собой  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}^8$ ,  $-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})-$ ,  $-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ циклоалкил})-$ ,  $-\text{арил}-$ ,  $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8 \text{ алкил})-$ ,  $-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})-\text{арил}-$ ,  $-\text{арил}-(\text{C}_1-\text{C}_{10} \text{ алкил})-$ ,  $-(\text{C}_1-\text{C}_{10}$

алкил)-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкил)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкил)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(5-8-членный гетероарил)-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил)-(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил)-(5-8-членный гетероарил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил)-, -(5-8-членный гетероарил)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил)-, -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>f</sub>- или -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-;

каждый b<sub>1</sub> независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 6;

каждый e<sub>1</sub> независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 8;

каждый f<sub>1</sub> независимо представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6;

каждый f<sub>2</sub> независимо представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12 и

каждый g<sub>2</sub> независимо представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4.

[172] В некоторых вариантах осуществления b<sub>1</sub> равен 0. В некоторых вариантах осуществления b<sub>1</sub> равен 1.

[173] В некоторых вариантах осуществления каждый f<sub>1</sub> независимо равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления f<sub>1</sub> равен 1. В некоторых вариантах осуществления f<sub>1</sub> равен 2.

[174] В некоторых вариантах осуществления g<sub>2</sub> равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления g<sub>2</sub> равен 1. В некоторых вариантах осуществления g<sub>2</sub> равен 2.

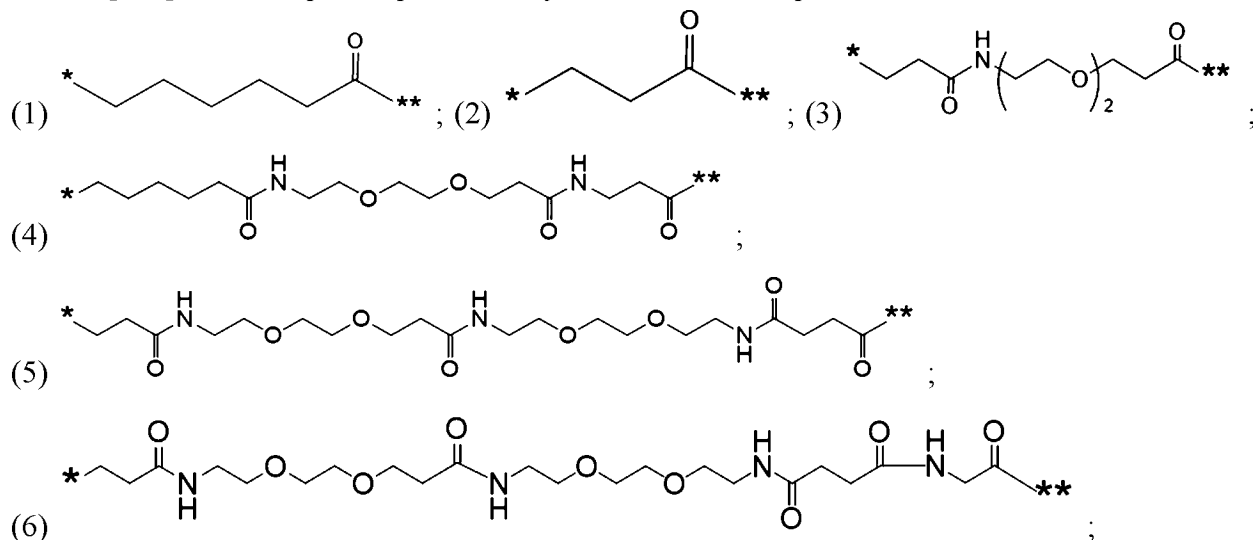
[175] В некоторых вариантах осуществления f<sub>2</sub> представляет собой целое число в диапазоне от 4 до 6.

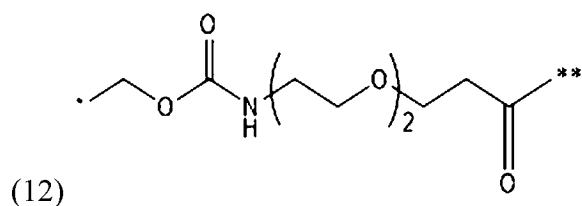
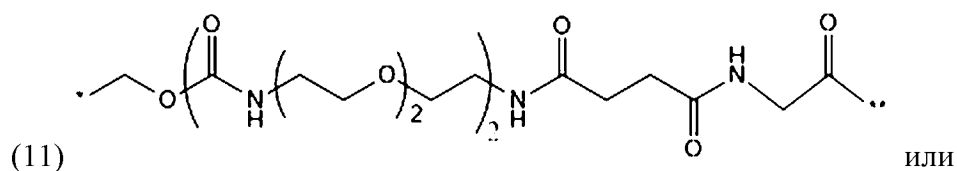
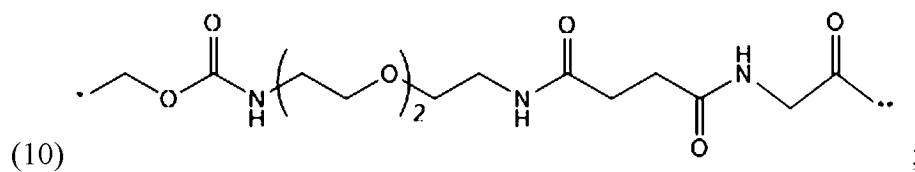
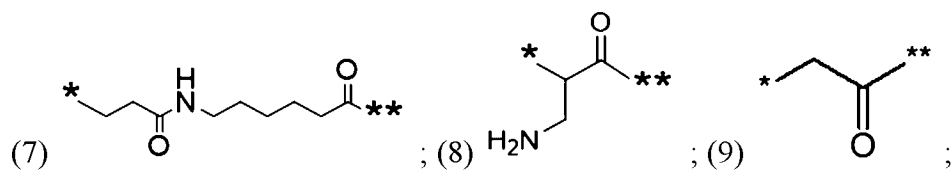
[176] В некоторых вариантах осуществления R<sup>7</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил)-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>f</sub>-, -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- или -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>f</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

[177] В некоторых вариантах осуществления R<sup>7</sup> представляет собой -O-, -NH-, -N(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- или -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

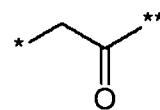
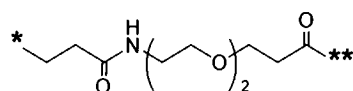
[178] Понятно, что для вариантов осуществления M<sup>P</sup>, \* обозначает присоединение к L<sup>P</sup> или L<sup>P</sup> и \*\* обозначает присоединение к L<sup>M</sup> или M<sup>A</sup>.

[179] В некоторых вариантах осуществления M<sup>P</sup> представляет собой:



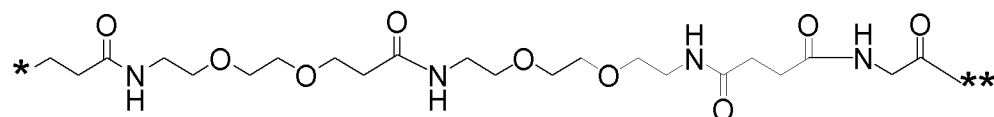


[180] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой

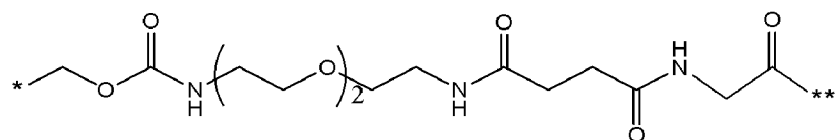


[181] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой

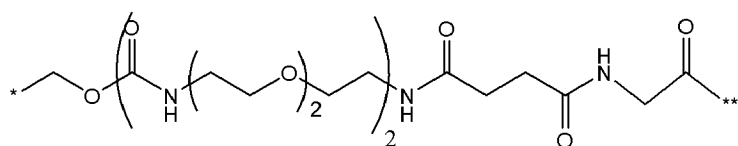
[182] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой



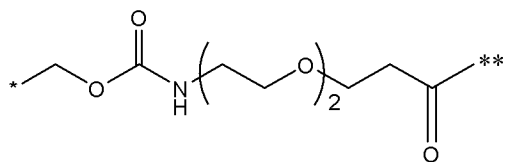
[183] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой



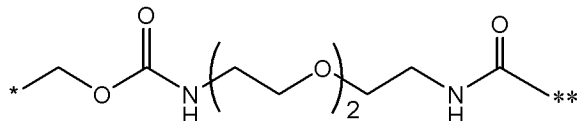
[184] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой



[185] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой



[186] В некоторых вариантах осуществления  $M^P$  представляет собой



### Вариабельный $L^M$

[187] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой связь (например, двухвалентный линкер, или имеющий 2 плеча) или линкер с несколькими плечами (например, трехвалентный или четырехвалентный, или имеющий 3 или 4 плеча), где плечи могут быть одинаковыми или разными.

[188] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой связь (например, двухвалентный линкер или имеющий 2 плеча) или линкер с несколькими плечами (например, четырехвалентный, или имеющий 4 плеча; трехвалентный, имеющий 3 плеча), где плечи могут быть одинаковыми или разными.

[189] Понятно, что термин "плечо", как используют в рамках изобретения, относится к части  $L^M$ , которая (1) соединена с  $M^P$ , когда он присутствует, или (2) соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или соединена с  $M^A$ , когда  $L^3$  отсутствует.

[190] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой связь (например, двухвалентный линкер, или имеющий 2 плеча).

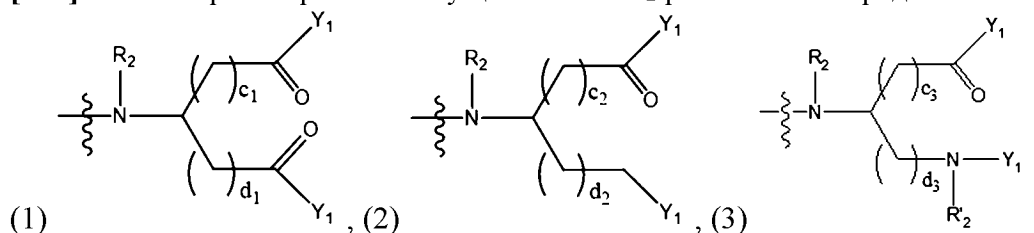
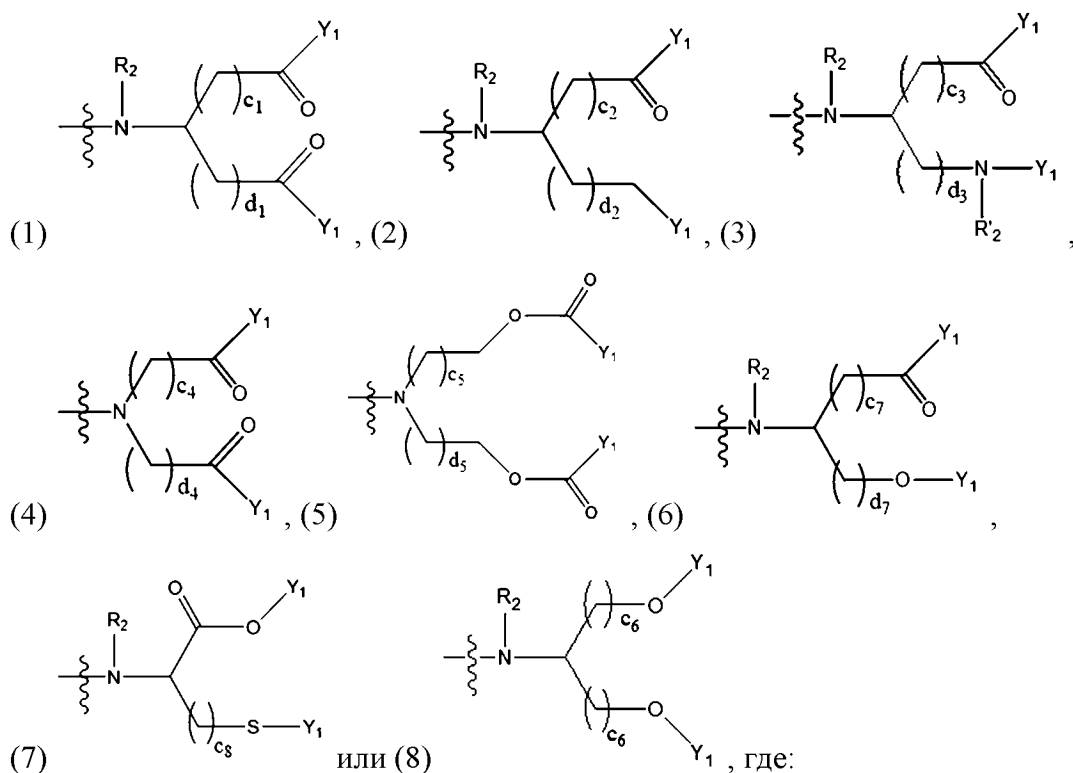
[191] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой линкер с несколькими плечами (например, трехвалентный или четырехвалентный, или имеющий 3 или 4 плеча), где плечи могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой линкер с несколькими плечами (например, трехвалентный или четырехвалентный, или имеющий 3 или 4 плеча).

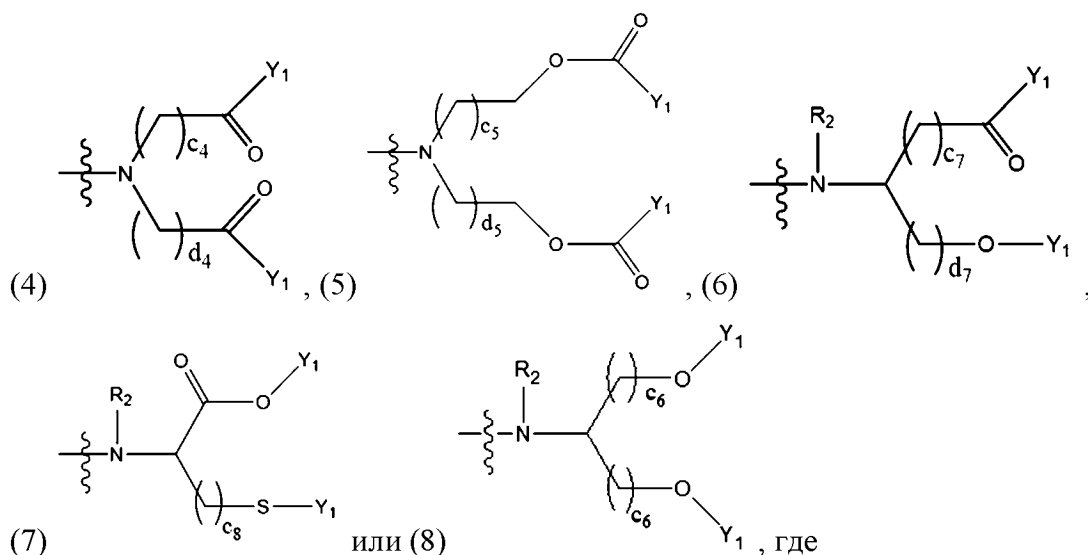
[192] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой трехвалентный линкер, имеющий 3 плеча, где плечи могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой трехвалентный линкер, имеющий 3 плеча, где плечи могут быть одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой трехвалентный линкер, имеющий 3 плеча, где плечи могут быть разными.

[193] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой четырехвалентный линкер, имеющий 4 плеча, где плечи могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой четырехвалентный линкер, имеющий 4 плеча, где плечи могут быть одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой четырехвалентный линкер, имеющий 4 плеча, где плечи могут быть разными.

[194] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 2 и  $L^M$  представляет собой







обозначает присоединение к  $\text{M}^{\text{P}}$ ;

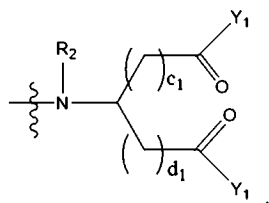
$\text{Y}_1$  обозначает присоединение к  $\text{L}^3$ , когда он присутствует, или присоединение к  $\text{M}^{\text{A}}$ , когда  $\text{L}^3$  отсутствует;

каждый из  $\text{R}_2$  и  $\text{R}'_2$  независимо представляет собой водород, необязательно замещенный  $\text{C}_{1-6}$  алкил, необязательно замещенный  $\text{C}_{2-6}$  алкенил, необязательно замещенный  $\text{C}_{2-6}$  алкинил, необязательно замещенный  $\text{C}_{3-19}$  разветвленный алкил, необязательно замещенный  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил, необязательно замещенный  $\text{C}_{6-10}$  арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный  $\text{C}_{1-6}$  гетероалкил,  $\text{C}_{1-6}$  алкокси, арилокси,  $\text{C}_{1-6}$  гетероалкокси,  $\text{C}_{2-6}$  алканойл, необязательно замещенный арилкарбонил,  $\text{C}_{2-6}$  алкоксикарбонил,  $\text{C}_{2-6}$  алканойлокси, арилкарбонийлокси, необязательно замещенный  $\text{C}_{2-6}$  алканойл, необязательно замещенный  $\text{C}_{2-6}$  алканойлокси, необязательно замещенный  $\text{C}_{2-6}$  замещенный алканойлокси,  $\text{---COOH}$  или  $\text{---COO---C}_{1-6}$  алкил;

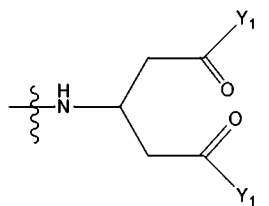
каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$ , когда он присутствует, представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$ , когда он присутствует, представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10.

[196] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 2 и  $\text{L}^{\text{M}}$  представляет собой



[197] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 2 и  $\text{L}^{\text{M}}$  представляет собой

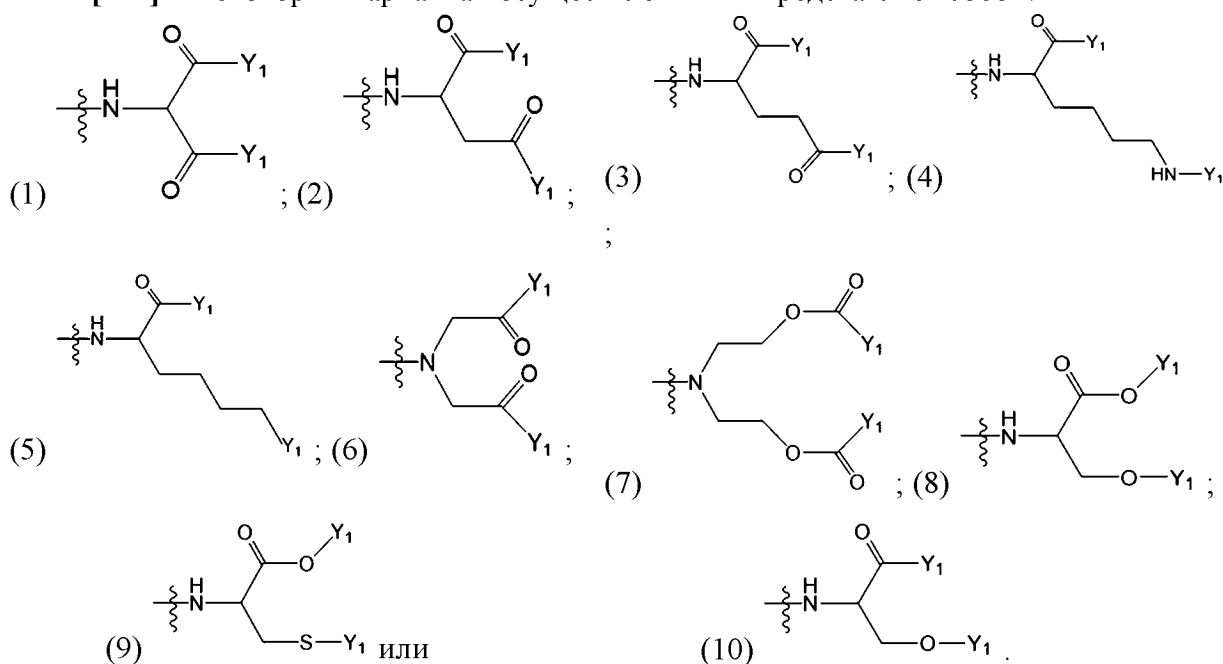


[198] В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$ , когда он присутствует, независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$  независимо равен 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$  независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$  независимо равен 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$  независимо равен 0. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$  независимо равен 1. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_7$  и  $c_8$  независимо равен 2.

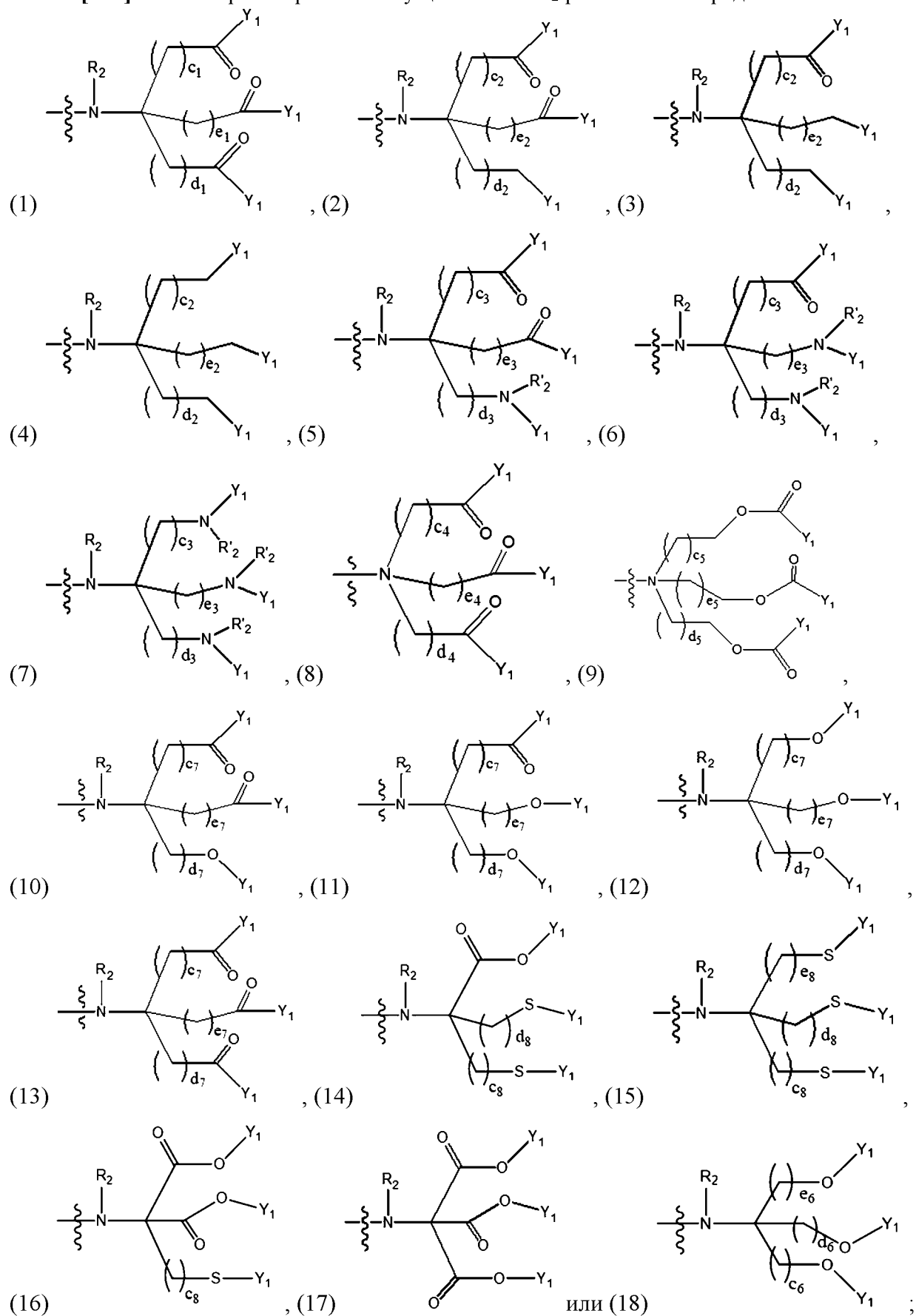
[199] В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$ , когда он присутствует, независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 1. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 2. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 3. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  и  $d_7$  независимо равен 4.

[200] В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R_2$  и  $R'_2$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R_2$  и  $R'_2$  независимо представляет собой водород или  $C_{1-6}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R_2$  и  $R'_2$  независимо представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $R_2$  и  $R'_2$  независимо представляет собой  $C_{1-6}$  алкил.

[201] В некоторых вариантах осуществления  $L^M$  представляет собой:



[202] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 3 и  $L^M$  представляет собой



где:

$\{$  обозначает присоединение к  $M^P$ , когда он присутствует, или присоединение к  $L^P$  или  $L^P$ , когда  $M^P$  отсутствует;

$Y_1$  обозначает присоединение к  $L^3$ , когда он присутствует, или присоединение к  $M^A$ , когда  $L^3$  отсутствует;

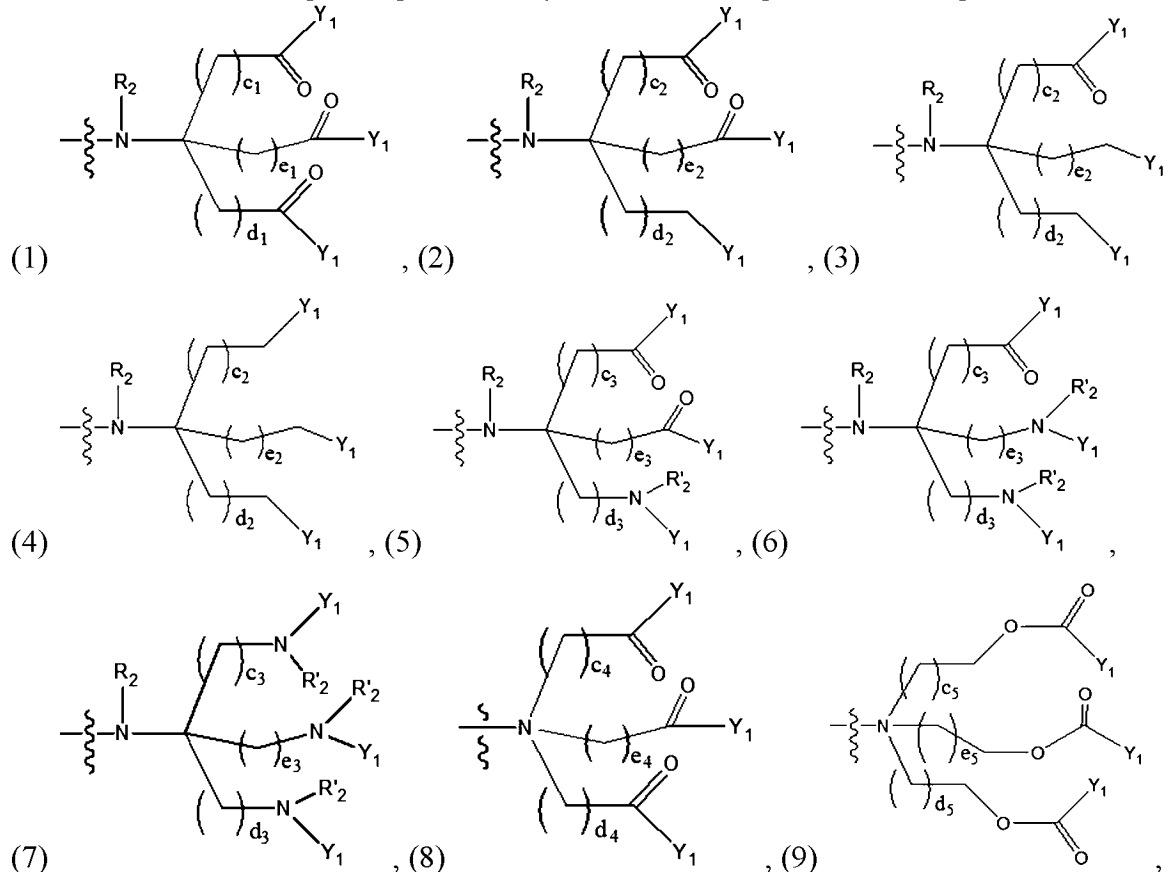
каждый из  $R_2$  и  $R'_2$  независимо представляет собой водород, необязательно замещенный  $C_{1-6}$  алкил, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алкенил, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алкинил, необязательно замещенный  $C_{3-19}$  разветвленный алкил, необязательно замещенный  $C_{3-8}$  циклоалкил, необязательно замещенный  $C_{6-10}$  арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный  $C_{1-6}$  гетероалкил,  $C_{1-6}$  алкокси, арилокси,  $C_{1-6}$  гетероалкокси,  $C_{2-6}$  алканойл, необязательно замещенный арилкарбонил,  $C_{2-6}$  алкоксикарбонил,  $C_{2-6}$  алканойлокси, арилкарбонийлокси, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алканойл, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алканойлокси, необязательно замещенный  $C_{2-6}$ -замещенный алканойлокси,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил;

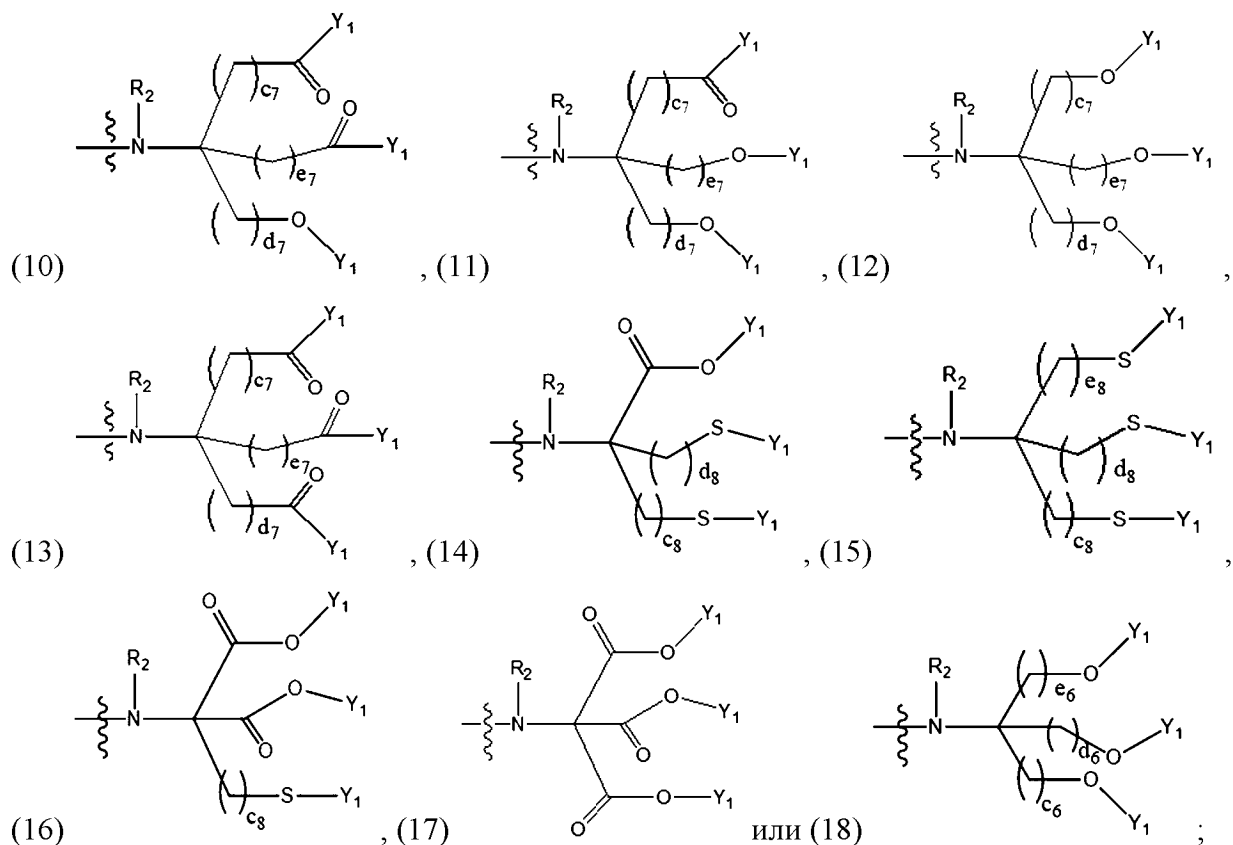
каждый из  $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6, c_7$  и  $c_8$  представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10;

каждый из  $d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6, d_7$  и  $d_8$  представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из  $e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6, e_7$  и  $e_8$  представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10.

[203] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 3 и  $L^M$  представляет собой





где:

$\sim$  обозначает присоединение к  $M^P$ ;

$Y_1$  обозначает присоединение к  $L^3$ , когда он присутствует, или присоединение к  $M^A$ , когда  $L^3$  отсутствует;

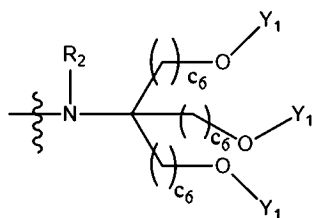
каждый из  $R_2$  и  $R'_2$  независимо представляет собой водород, необязательно замещенный  $C_{1-6}$  алкил, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алкенил, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алкинил, необязательно замещенный  $C_{3-19}$  разветвленный алкил, необязательно замещенный  $C_{3-8}$  циклоалкил, необязательно замещенный  $C_{6-10}$  арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный  $C_{1-6}$  гетероалкил,  $C_{1-6}$  алкокси, арилокси,  $C_{1-6}$  гетероалкокси,  $C_{2-6}$  алканоил, необязательно замещенный арилкарбонил,  $C_{2-6}$  алкоксикарбонил,  $C_{2-6}$  алканоилокси, арилкарбонилокси, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алканоил, необязательно замещенный  $C_{2-6}$  алканоилокси, необязательно замещенный  $C_{2-6}$ -замещенный алканоилокси,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил;

каждый из  $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6, c_7$  и  $c_8$  представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10;

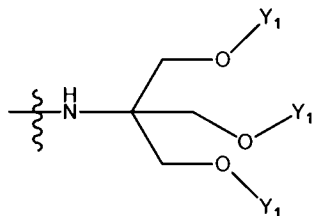
каждый из  $d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6, d_7$  и  $d_8$  представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из  $e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6, e_7$  и  $e_8$  представляет собой целое число, независимо находящееся в диапазоне от 0 до 10.

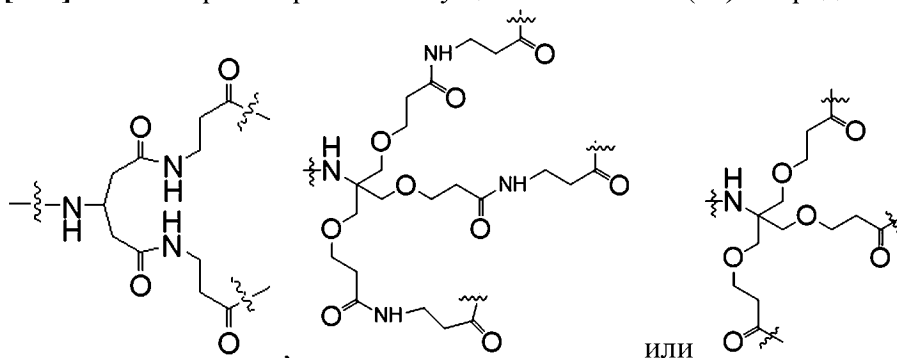
[204] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 3 и  $L^M$  представляет собой



[205] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 3 и  $L^M$  представляет собой



[206] В некоторых вариантах осуществления  $-L^M-(L^3)_{a2}-$  представляет собой:

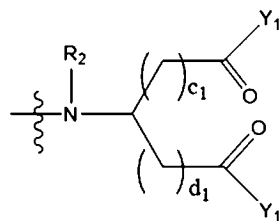


[207] В некоторых вариантах осуществления, где аминокислотный элемент имеет два участка присоединения (т.е. концевой лекарственный элемент), один из участков присоединения, показанных выше, может быть заменен, например, на H, OH или  $C_{1-3}$ -незамещенную алкильную группу.

[208] В некоторых вариантах осуществления, когда  $L^M$  представляет собой линкер с несколькими плечами и он, тем не менее, не соединен с удлинителем элементом  $M^P$ ,  $W^M$  является концом  $L^M$  и  $W^M$  в каждом случае независимо представляет собой водород, защитную группу, уходящую группу или функциональную группу, которая способна соединять  $L^M$  с  $M^P$  путем образования ковалентной связи.

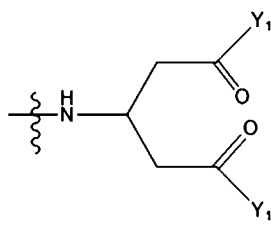
[209] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой защитную группу для амина. В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой ВОС.

[210] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой защитную



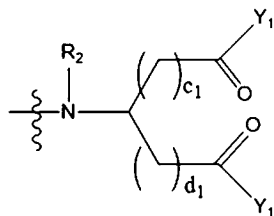
группу для амина и  $L^M$  представляет собой

[211] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой защитную



группу для амина и  $L^M$  представляет собой

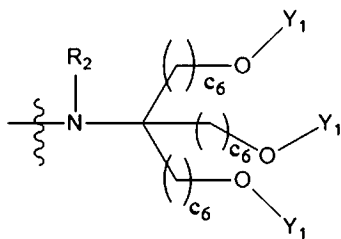
[212] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой БОС и  $L^M$



представляет собой

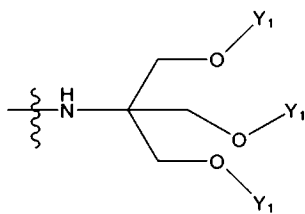
[213] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  содержит аминогруппу. В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  содержит  $-C(O)-(CH_2)_w-NH_2$ , где  $w$  представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой  $-C(O)-CH_2-NH_2$ .

[214] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой  $-C(O)-CH_2-NH_2$



и  $L^M$  представляет собой

[215] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой  $-C(O)-CH_2-NH_2$



и  $L^M$  представляет собой

[216] В некоторых вариантах осуществления  $W^M$  представляет собой Н.

**Вариабельный  $L^3$**

[217] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^3$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^3$  представляет собой карбонил-содержащую часть.

[218] Понятно, что для вариантов осуществления  $L^3$ , \* указывает на присоединение к другому  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $L^M$ , и \*\* указывает на присоединение к другому  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $M^A$ .

[219] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^3$ , когда он присутствует, независимо представляет собой \*-C<sub>1-12</sub> алкил-C(O)-\*\*, \*-NH-C<sub>1-12</sub> алкил-C(O)-\*\* или \*-C<sub>1-12</sub> алкил-C(O)-NH-C<sub>1-12</sub> алкил-C(O)-\*\*.

[220] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой \*-C<sub>1-12</sub> алкил-C(O)-\*\*.



[221] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[222] В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[223] В некоторых вариантах осуществления  $(L^3)_{a3}$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[224] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-NH-C_{1-12}$  алкил- $C(O)-^{**}$ .

[225] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[226] В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  представляет собой  $^*-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[227] В некоторых вариантах осуществления  $(L^3)_{a3}$  представляет собой  $^*-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[228] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-C_{1-12}$  алкил- $C(O)-NH-C_{1-12}$  алкил- $C(O)-^{**}$ .

[229] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[230] В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[231] В некоторых вариантах осуществления  $(L^3)_{a3}$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[232] В некоторых вариантах осуществления  $a_3$  равен 2 или более, по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-C_{1-12}$  алкил- $C(O)-^{**}$  и по меньшей мере один  $L^3$  представляет собой  $^*-NH-C_{1-12}$  алкил- $C(O)-^{**}$ .

[233] В некоторых вариантах осуществления  $(L^3)_{a3}$  представляет собой  $^*-CH_2CH_2-C(O)-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

[234] В некоторых вариантах осуществления  $(L^3)_{a3}$  представляет собой  $^*NH-CH_2CH_2-C(O)-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ .

#### **Вариабельный $M^A$**

[235] В некоторых вариантах осуществления  $M^A$  представляет собой линкерную часть, которая способна соединять одно или несколько лекарственных средств и одну или несколько гидрофильных групп с  $L^P$  или  $L^P$ . В некоторых вариантах осуществления  $M^A$  содержит пептидную часть из по меньшей мере двух аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислота обозначается в настоящем описании как "а.к." и аминокислоты обозначаются как "а.к."

[236] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть представляет собой часть, которая способна образовывать ковалентную связь с элементом  $-L^D-D$  и позволяет присоединение множества лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит один а.к.-элемент или два или более а.к.-элементов (например,

от 2 до 10, от 2 до 6, или 2, 3, 4, 5 или 6), где каждый из а.к.-элементов независимо представляет собой природную или неприродную аминокислоту, аминспирт, аминокальдегид, диамин, полиамин или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления для наличия требуемого количества присоединений по меньшей мере один из а.к.-элементов имеет функционализированную боковую цепь для обеспечения присоединения элемента -L<sup>D</sup>-D. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные функционализированные а.к.-элементы (например, аминокислоты, аминспирты или аминокальдегиды) включают, например, азидо- или алкин-функционализированные а.к.-элементы (например, аминокислота, аминспирт или аминокальдегид, модифицированные для наличия азидной группы или группы алкина). В некоторых вариантах осуществления предусматривается присоединение азидной группы или группы алкина с использованием клик-химии.

**[237]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 2-12 а.к.-элементов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 2-10 а.к.-элементов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 2-6 а.к.-элементов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 2, 3, 4, 5 или 6 а.к.-элементов.

**[238]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 2 а.к.-элемента. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 3 а.к.-элемента. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 4 а.к.-элемента. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 5 а.к.-элементов. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть имеет 6 а.к.-элементов.

**[239]** В некоторых вариантах осуществления присоединение в пределах пептидной части к другим компонентам конъюгата, его промежуточным соединениям или каркасу может быть осуществлено, например, через амина, карбокси или другие функциональные группы. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота пептидной части может независимо представлять собой D -или L-изомер тиол-содержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота пептидной части может представлять собой D-изомер тиол-содержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота пептидной части может независимо представлять собой L-изомер тиол-содержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления тиол-содержащая аминокислота может представлять собой, например, цистеин, гомоцистеин или пеницилламин.

**[240]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота, которая содержит пептидную часть, может независимо представлять собой L- или D-изомер следующих аминокислот: аланин (включая β-аланин), аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, цистеин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, метионин, серин, тирозин, треонин, триптофан, пролин, орнитин, пеницилламин, аминалкиновая кислота, аминалкандиовая кислота, гетероциклокарбоновая кислота, цитруллин, статин, диаминалкановая кислота, их

стереоизомеры или их производные.

**[241]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота, которая содержит пептидную часть, независимо представляет собой цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глицин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин, аланин или их стереоизомеры.

**[242]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит монопептид, дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит пентапептид.

**[243]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит по меньшей мере приблизительно пять аминокислот (например, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит не более чем приблизительно десять аминокислот.

**[244]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота, которая содержит пептидную часть, независимо представляет собой глицин, серин, глутаминовую кислоту, лизин, аспарагиновую кислоту и цистеин.

**[245]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит по меньшей мере четыре остатка глицина и по меньшей мере один остаток серина, например, (глицин)<sub>4</sub> и серин, где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи, как например, (серин)-(глицин)<sub>4</sub>; (глицин)-(серин)-(глицин)<sub>3</sub>; (глицин)<sub>2</sub>-(серин)-(глицин)<sub>2</sub>; (глицин)<sub>3</sub>-(серин)-(глицин) или (глицин)<sub>4</sub>-(серин).

**[246]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>4</sub>-(серин) или (серин)-(глицин)<sub>4</sub>. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>4</sub>-(серин). В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (серин)-(глицин)<sub>4</sub>.

**[247]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит по меньшей мере четыре остатка глицина и по меньшей мере один остаток глутаминовой кислоты, например, (глицин)<sub>4</sub> и глутаминовую кислоту, где глутаминовая кислота находится в любом положении вдоль пептидной цепи.

**[248]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)<sub>4</sub> или (глицин)<sub>4</sub>-(глутаминовую кислоту).

**[249]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)<sub>4</sub>-(серин), где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи.

**[250]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>4</sub>-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)<sub>4</sub>-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи.

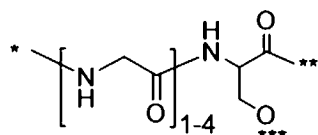
**[251]** В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>1-4</sub>-(серин), где пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup>

отсутствует, через один из остатков глицина; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через серин; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через серин.

[252] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (серин)-глицин)<sub>1-4</sub>, где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через серин; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через глицин; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через серин.

[253] Понятно, что для вариантов осуществления пептидной части \* указывает на присоединение к  $L^3$ , когда он присутствует, или к  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления \*\* указывает на присоединение к  $T^1$ , когда он присутствует, или -ОН, когда  $T^1$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления \*\*\* указывает на присоединение к  $L^D$ , когда он присутствует, или водороду, когда  $L^D$  отсутствует.

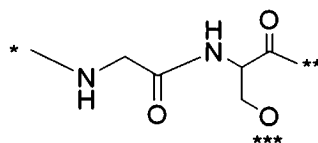
[254] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[255] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)-серин), где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через глицин; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через серин; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через серин.

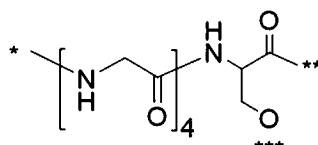
[256] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)-серин), где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через серин; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через глицин; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через серин.

[257] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



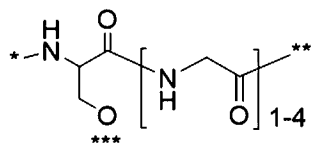
[258] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>4</sub>-серин), где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через один из остатков глицина; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через серин; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через серин.

[259] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит

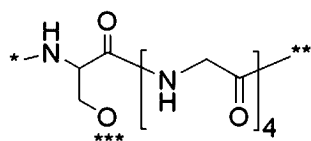


[260] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (серин)-(глицин)<sub>4</sub>, где пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через серин; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через один из остатков глицина; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через серин.

[261] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит

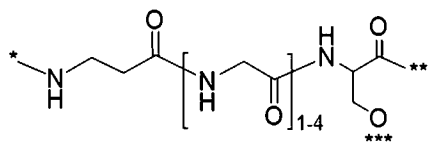


[262] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[263] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)<sub>1-4</sub>-(серин), где пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через β-аланин; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через серин; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через серин.

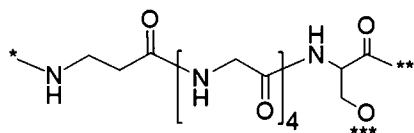
[264] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[265] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)<sub>4</sub>-(серин), где:

пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через β-аланин; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через серин; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через серин.

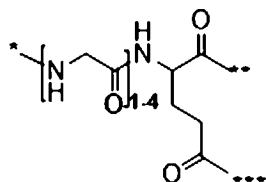
[266] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[267] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>1-4</sub>-(глутаминовую кислоту), где пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через один из остатков глицина; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

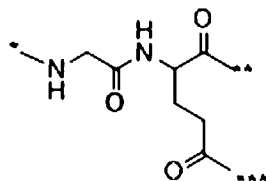
[268] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>1-4</sub>- (глутаминовую кислоту), где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через глицин; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

[269] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



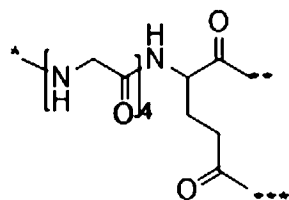
[270] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)- (глутаминовую кислоту), где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через глицин; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

[271] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



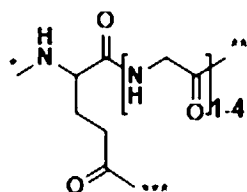
[272] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глицин)<sub>4</sub>- (глутаминовую кислоту), где пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через один из остатков глицина; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

[273] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит

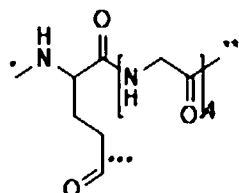


[274] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)<sub>1-4</sub>, где: пептидная часть соединена с  $L^3$ , когда он присутствует, или с  $L^M$ , когда  $L^3$  отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная часть соединена с  $T^1$ , когда он присутствует, через один из остатков глицина; и пептидная часть соединена с  $L^D$ , когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

[275] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит

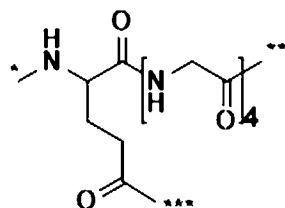


[276] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[277] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)<sub>4</sub>, где: пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через один из остатков глицина; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

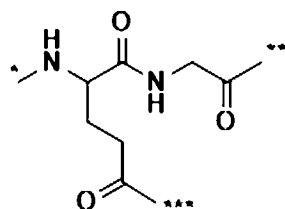
[278] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[279] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин), где:

пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через один из остатков глицина; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

[280] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит

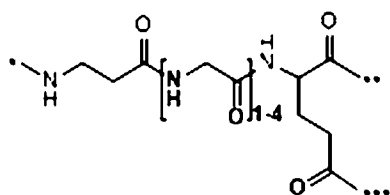


[281] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)<sub>1-4</sub>-(глутаминовую кислоту), где:

пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через β-аланин; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через

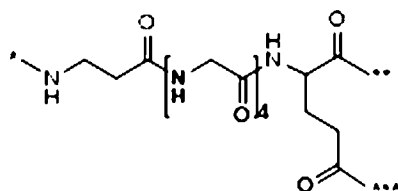
глутаминовую кислоту.

[282] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[283] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)<sub>4</sub>-(глутаминовую кислоту), где: пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через β-аланин; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

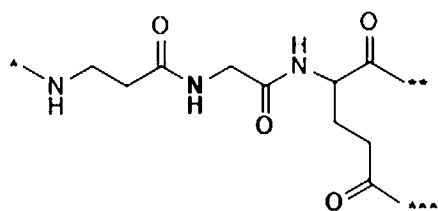
[284] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



[285] Понятно, что для вариантов осуществления M<sup>A</sup> \* указывает на присоединение к L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или к L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, \*\* указывает на присоединение к T<sup>1</sup> и \*\*\* указывает на присоединение к L<sup>D</sup>.

[286] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит (β-аланин)-(глицин)-(глутаминовую кислоту), где: пептидная часть соединена с L<sup>3</sup>, когда он присутствует, или с L<sup>M</sup>, когда L<sup>3</sup> отсутствует, через β-аланин; пептидная часть соединена с T<sup>1</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная часть соединена с L<sup>D</sup>, когда он присутствует, через глутаминовую кислоту.

[287] В некоторых вариантах осуществления пептидная часть содержит



### Вариабельный L<sup>D</sup>

[288] В некоторых вариантах осуществления каждый L<sup>D</sup> независимо представляет собой двухвалентную линкерную часть, соединяющую D с M<sup>A</sup>. В некоторых вариантах осуществления каждый L<sup>D</sup> содержит по меньшей мере одну расщепляемую связь, так что, когда связь расщепляется, D высвобождается в активной форме для его предполагаемого терапевтического эффекта.

[289] В некоторых вариантах осуществления L<sup>D</sup> содержит одну расщепляемую





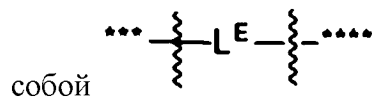
аминокислотный элемент;

w представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 0 до приблизительно 12;

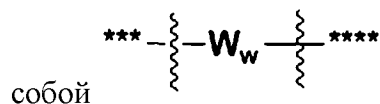
\*\*\* обозначает присоединение к  $M^A$ ; и

\*\*\*\* обозначает присоединение к D.

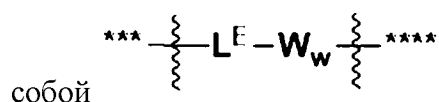
[297] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^D$  независимо представляет



[298] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^D$  независимо представляет



[299] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^D$  независимо представляет



[300] В некоторых вариантах осуществления  $L^E$  содержит по меньшей мере один элемент ПЭГ.

[301] В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 1 субэлемент, по меньшей мере 2 субэлемента, по меньшей мере 3 субэлемента, по меньшей мере 4 субэлемента, по меньшей мере 5 субэлементов или по меньшей мере 6 субэлементов. В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 4 субэлемента, по меньшей мере 3 субэлемента, по меньшей мере 2 субэлемента или по меньшей мере 1 субэлемент.

[302] В некоторых вариантах осуществления элемент PEG содержит по меньшей мере 1 субэлемент.

[303] В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 2 субэлемента.

[304] В некоторых вариантах осуществления r представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6 или от приблизительно 1 до приблизительно 5.

[305] В некоторых вариантах осуществления r представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 6. В некоторых вариантах осуществления r представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 4. В некоторых вариантах осуществления r представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 2.

[306] В некоторых вариантах осуществления r равен 2.

[307] В некоторых вариантах осуществления q представляет собой целое число в

диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6 или от приблизительно 1 до приблизительно 5.

**[308]** В некоторых вариантах осуществления  $q$  равен 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $q$  равен 2.

**[309]** В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-4}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-(\text{CH}_2)_{0-2}-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-(\text{CH}_2)-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-(\text{CH}_2)_{0-2}-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-(\text{C}_1-\text{C}_6 \text{ алкил})-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-4}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{C}_1-\text{C}_6 \text{ алкил})-\text{O}-\text{C}(\text{O})]-$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^E$ , когда он присутствует, представляет собой  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ .

**[310]** В некоторых вариантах осуществления  $w$  представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 12 (например, от 1 до 6, или от 1 до 4, или от 1 до 3, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12).

**[311]** В некоторых вариантах осуществления  $w$  равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $w$  равен 1, 2, 3, 4 или 5.

**[312]** В некоторых вариантах осуществления  $w$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $w$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления  $w$  равен 3.

**[313]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $W$  независимо представляет собой природную или неприродную аминокислоту и/или D- или L-изомер.

**[314]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $W$  независимо представляет собой альфа-, бета- или гамма-аминокислоту, которая является природной или неприродной.

**[315]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W$  представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один  $W$  представляет собой неприродную аминокислоту.

**[316]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  не содержит природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  не содержит неприродные аминокислоты.

[317] В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит природную аминокислоту, соединенную с неприродной аминокислотой.

**[318]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит природную аминокислоту, соединенную с D-изомером природной аминокислоты.

**[319]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  представляет собой дипептид, например, -Val-Cit-, -Phe-Lys-, -Val-Ala- или Glu-Ala.

**[320]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  представляет собой монопептидный, дипептидный, трипептидный, тетрапептидный, пентапептидный, гексапептидный, гептапептидный, октапептидный, гексапептидный, гептапептидный, октапептидный, нонапептидный, декапептидный, ундекапептидный или додекапептидный элемент.

**[321]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  представляет собой пептид (например, пептид из 1-12 аминокислот), который конъюгирован непосредственно с D. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой единичную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой дипептид. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой трипептид.

[illegible]

**[323]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  независимо выбрана из аланина,  $\beta$ -аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цитруллина и их производных.

**[324]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  независимо выбрана из протеиногенных и непротеиногенных аминокислот.

**[325]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  независимо выбрана из L- или D-изомеров следующих аминокислот: аланин,  $\beta$ -аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, цистеин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, метионин, серин, тирозин, треонин, триптофан, пролин, орнитин, пеницилламин, аминокановая кислота, аминокандиовая кислота, гетероцикло-карбоновая кислота, цитруллин, статин, диаминокановая кислота, валин, цитруллин и их производные.

**[326]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  независимо представляет собой цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин,

глицин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин, цитруллин или аланин.

**[327]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  независимо выбрана из L-изомеров следующих аминокислот: аланин,  $\beta$ -аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, серин, тирозин, треонин, изолейцин, триптофан, цитруллин и валин.

**[328]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  независимо выбрана из D-изомеров следующих аминокислот: аланин,  $\beta$ -аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, серин, тирозин, треонин, изолейцин, триптофан, цитруллин и валин.

**[329]** В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в  $W_w$  представляет собой аланин,  $\beta$ -аланин, глицин, глутамин, глутаминовую кислоту, изоглутаминовую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, цитруллин или аспарагиновую кислоту.

**[330]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит  $\beta$ -аланин. В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит ( $\beta$ -аланин)-(аланин). В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит ( $\beta$ -аланин) и необязательно глутаминовую кислоту, глутамин, изоглутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, (валин)-(аланин), (аланин)-(аланин) или (валин)-(цитруллин).

**[331]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит (глутаминовую кислоту)-(аланин).

**[332]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит ( $\beta$ -аланин)-(глутамин).

**[333]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит ( $\beta$ -аланин)-(глутамин)-(аланин).

**[334]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит глутаминовую кислоту и необязательно аланин, глицин, изоглутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, (валин)-(аланин), (аланин)-(аланин) или (валин)-(цитруллин).

**[335]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит 2,3-диаминопропионовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит (R)-2,3-диаминопропионовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит (глутаминовую кислоту)-(аланин). В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)-(аланин).

**[336]** В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит L-глутаминовую кислоту, D-глутаминовую кислоту, (L-глутаминовую кислоту)-(L-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(D-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(L-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(D-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(L-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(D-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(D-

аланин) или (D-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(L-аланин).

[337] В некоторых вариантах осуществления  $W_w$  содержит карбаматную связь в дополнение к одной или нескольким аминокислотам.

[338] В некоторых вариантах осуществления  $L^D$  (например,  $W_w$ ) является селективным с точки зрения ферментативного расщепления (например, конкретным ферментом). В некоторых вариантах осуществления конкретный фермент представляет собой ассоциированную с опухолью протеазу.

[339] В некоторых вариантах осуществления  $L^D$  (например,  $W_w$ ) содержит связь, расщепление которой катализируется катепсином B, C и D, или протеазой плазмином.

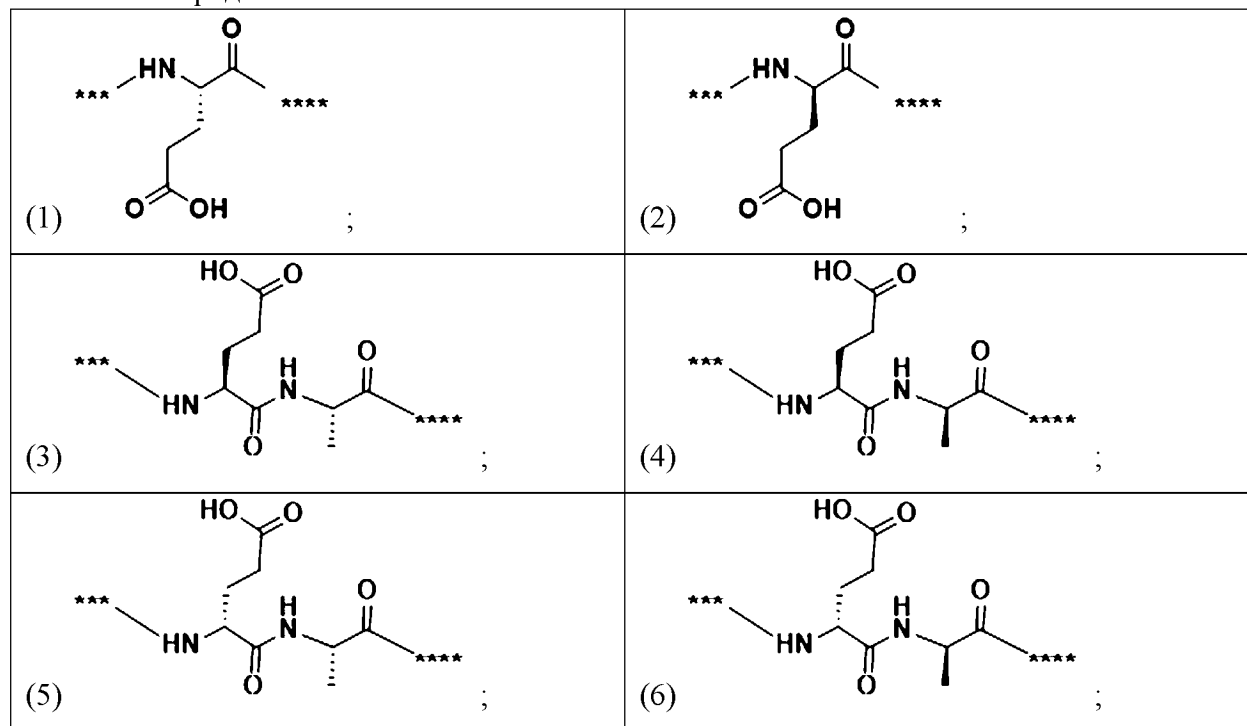
[340] В некоторых вариантах осуществления  $L^D$  содержит участок отщепления сахара.

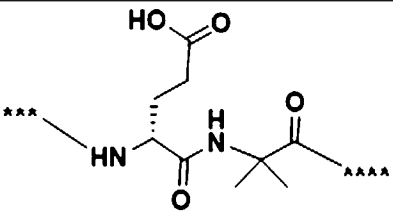
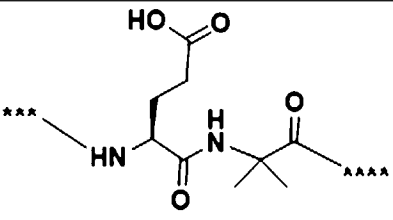
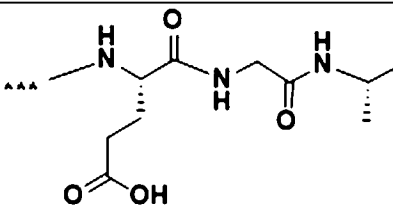
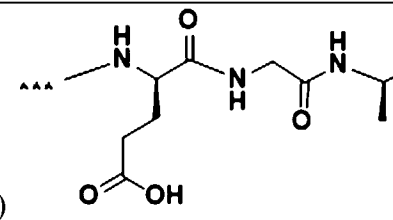
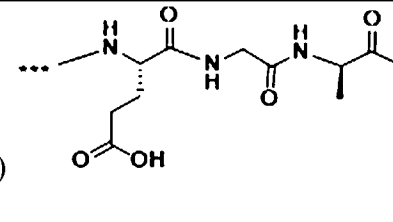
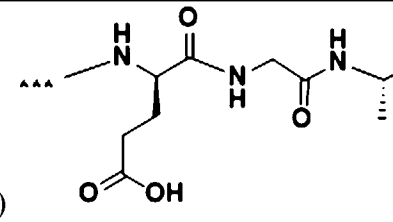
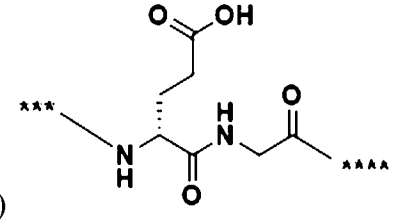
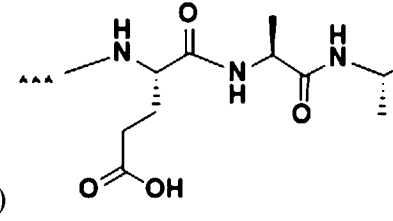
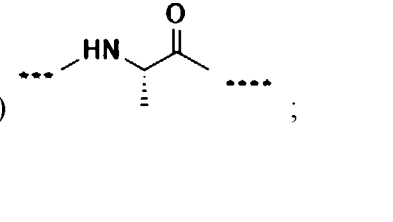
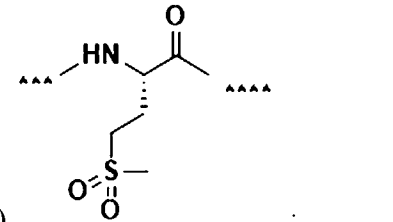
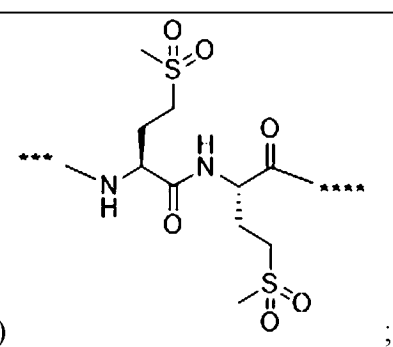
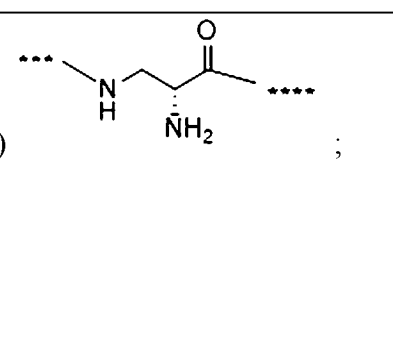
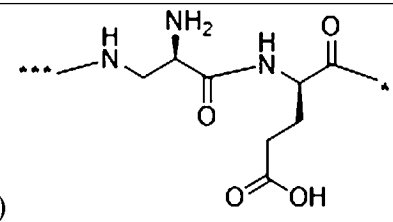
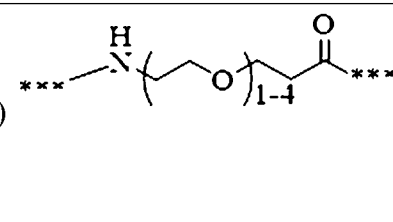
[341] В некоторых вариантах осуществления  $L^D$  содержит сахарную часть (Su), присоединенную через кислородную гликозидную связь к саморасщепляющейся группе.

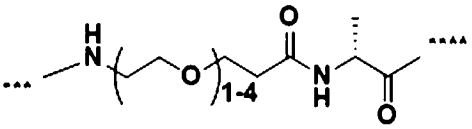
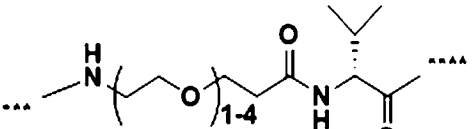
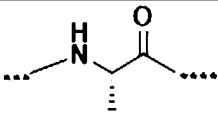
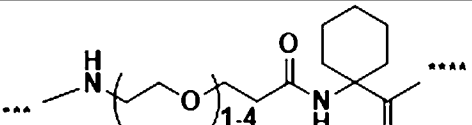
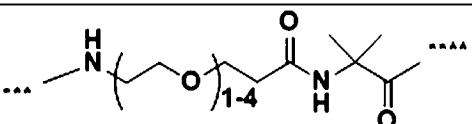
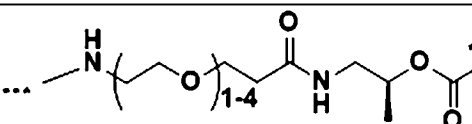
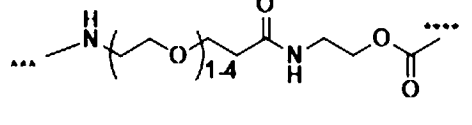
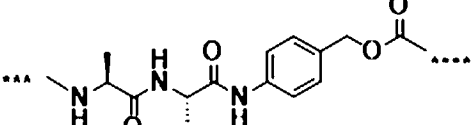
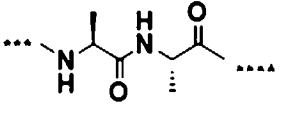
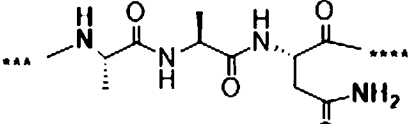
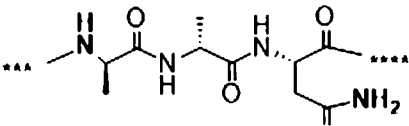
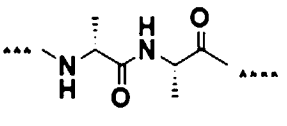
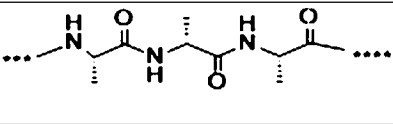
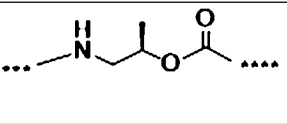
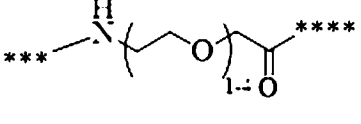
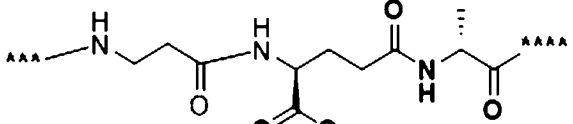
[342] В некоторых вариантах осуществления "саморасщепляющаяся группа" может представлять собой трифункциональную химическую часть, которая способна ковалентно связывать вместе три находящихся на расстоянии химических части (т.е. сахарную часть (через гликозидную связь), лекарственный элемент (прямо или непрямо) и  $M^A$  (прямо или непрямо), когда  $M^A$  присутствует, или  $A^1$ , когда  $M^A$  отсутствует).

[343] В некоторых вариантах осуществления гликозидная связь может быть расщеплена в целевой области для инициации последовательности реакций саморасщепления, которая приводит к высвобождению лекарственного средства.

[344] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^D$ , когда он присутствует, независимо представляет собой:

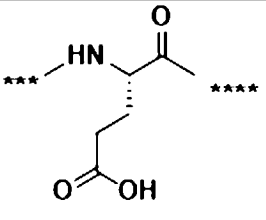
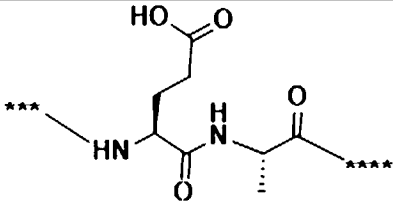


|                                                                                                          |                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(7)</p>  <p>;</p>    | <p>(8)</p>  <p>;</p>    |
| <p>(9)</p>  <p>;</p>    | <p>(10)</p>  <p>;</p>   |
| <p>(11)</p>  <p>;</p>   | <p>(12)</p>  <p>;</p>   |
| <p>(13)</p>  <p>;</p>  | <p>(14)</p>  <p>;</p>  |
| <p>(15)</p>  <p>;</p> | <p>(16)</p>  <p>;</p> |
| <p>(17)</p>  <p>;</p> | <p>(18)</p>  <p>;</p> |
| <p>(19)</p>  <p>;</p> | <p>(20)</p>  <p>;</p> |

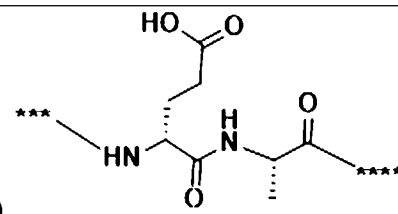
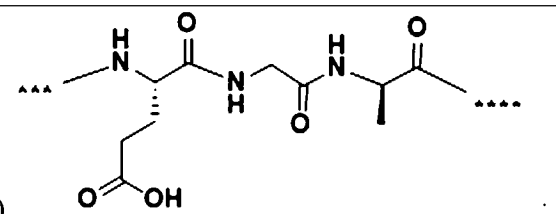
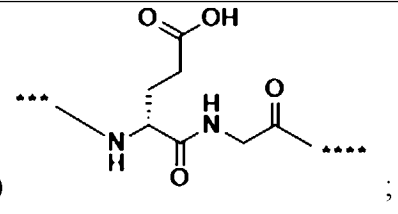
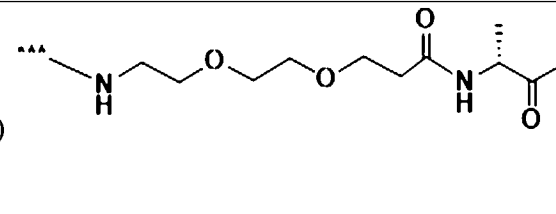
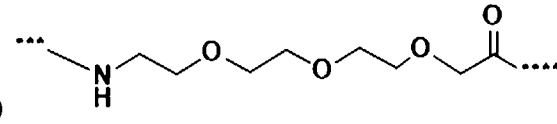
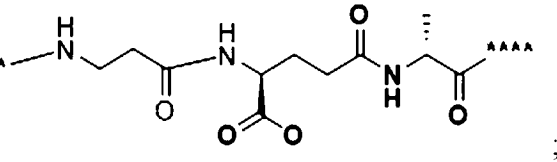
|                                                                                              |                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21)        | (22)    |
| (23)        | (24)    |
| (25)        | (26)    |
| (27)        | (28)    |
| (29)        | (30)    |
| (31)      | (32)  |
| (33)      | (34)  |
| (35)  или | (36)  |

где \*\*\* обозначает присоединение к  $M^A$ , и \*\*\*\* обозначает присоединение к D.

[345] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^D$ , когда он присутствует, независимо представляет собой:

|                                                                                         |                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1)  | (2)  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|



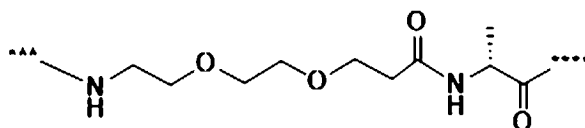
|                                                                                                    |                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>(3) ;</p>     |  <p>(4) ;</p> |
|  <p>(5) ;</p>     |  <p>(6) ;</p> |
|  <p>(7) ; или</p> |                                                                                                 |
|  <p>(8) ;</p>     |                                                                                                 |

где

\*\*\* обозначает присоединение к  $M^A$ ; и

\*\*\*\* обозначает присоединение к D.

[346] В некоторых вариантах осуществления каждый  $L^D$ , когда он присутствует,



независимо представляет собой

### Терапевтические средства, лекарственный элемент или переменный D

[347] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой часть лекарственного средства-агониста STING.

[348] В некоторых вариантах осуществления часть цитотоксического лекарственного средства представляет собой низкомолекулярное соединение.

[349] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет молекулярную массу  $\leq$  приблизительно 5 кДа (например, имеет молекулярную массу  $\leq$  приблизительно 4 кДа,  $\leq$  приблизительно 3 кДа,  $\leq$  приблизительно 1,5 кДа или  $\leq$  приблизительно 1 кДа).

[350] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  приблизительно менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления часть цитотоксического лекарственного средства или часть лекарственного средства-агониста STING имеет  $IC_{50}$  менее 1 нМ.

[351] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  приблизительно более 1 нМ (например, часть цитотоксического лекарственного средства или часть лекарственного средства-агониста STING имеет  $IC_{50}$  приблизительно от 1 до 50 нМ). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  приблизительно более 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  более 1 нМ (например, часть цитотоксического лекарственного средства или часть лекарственного средства-агониста STING имеет  $IC_{50}$  1-50 нМ). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  более 1 нМ.

[352] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство, имеющее  $IC_{50}$  более чем приблизительно 1 нМ (например, "менее эффективные лекарственные средства"), является непригодным для конъюгации с антителом с использованием известных в данной области способов конъюгации. Без связи с теорией, такие терапевтические средства (т.е. части цитотоксического лекарственного средства или части лекарственного средства-агониста STING) обладают эффективностью, которая является недостаточной для применения в таргетных конъюгатах антитело-лекарственное средство с использованием общепринятых способов, поскольку достаточное количество копий лекарственного средства (т.е. более 8) не может быть конъюгировано с использованием известных в данной области способов без ухудшения фармакокинетических и физико-химических свойств конъюгата. В некоторых вариантах осуществления с использованием стратегий конъюгации, описанных в настоящем описании, могут быть достигнуты достаточно высокие нагрузки этими менее эффективными лекарственными средствами, тем самым обеспечивая высокую нагрузку терапевтическим средством при сохранении желаемых фармакокинетических и физико-химических свойств. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, который включает антитело, каркас и по меньшей мере восемь частей терапевтического средства (т.е. частей цитотоксического лекарственного средства или частей лекарственных средств-агонистов STING), где терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  более чем приблизительно 1 нМ.

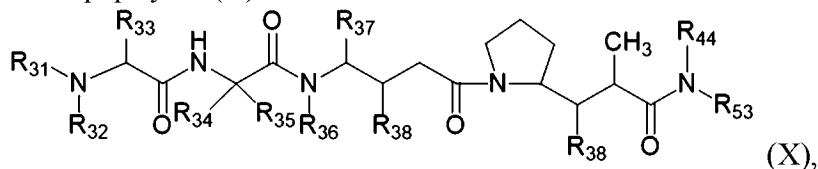
#### **Часть цитотоксического лекарственного средства (вариабельный D)**

[353] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления часть цитотоксического лекарственного средства представляет собой производное (a) соединения ауристатина; (b) соединения калихеамицина; (c) соединения дуокармицина; (d) SN38, (e) пирролобензодиазепина; (f) соединения барвинка; (g) соединения тубулизина; (h) не природного соединения камптотецина; (i) соединения майтанзиноида; (j) ДНК-связывающего лекарственного средства; (k) ингибитора киназы; (l) ингибитора MEK; (m) ингибитора KSP; (n) ингибитора топоизомеразы; (o) ДНК-алкилирующего лекарственного средства; (p) РНК-полимеразы; (q) ингибитора PARP; (r) ингибитора NAMPT; (s) ингибитора топоизомеразы; (t) ингибитора синтеза белков; (u) ДНК-связывающего лекарственного средства; (v) интеркалирующего ДНК лекарственного

средства; или (w) иммуномодулирующего соединения, как описано в US 2018/0154018, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[354] В некоторых вариантах осуществления часть цитотоксического лекарственного средства представляет собой ауристатин F-гидроксипропиламид-L-аланин.

[355] В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой соединение формулы (X):



где:

каждый из  $R_{31}$  и  $R_{32}$  независимо представляет собой водород или  $C_{1-8}$  алкил и не более чем один из  $R_{31}$  и  $R_{32}$  представляет собой H;

$R_{33}$  представляет собой водород,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $C_{6-10}$  арил,  $C_{1-8}$  алкил- $C_{6-10}$  арил,  $X^1$ -( $C_{3-8}$  карбоцикл),  $C_{3-8}$  гетероцикл или  $X^1$ -( $C_{3-8}$  гетероцикл);

$R_{34}$  представляет собой водород,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $C_{6-10}$  арил,  $X^1$ - $C_{6-10}$  арил,  $X^1$ -( $C_{3-8}$  карбоцикл),  $C_{3-8}$  гетероцикл или  $X^1$ -( $C_{3-8}$  гетероцикл);

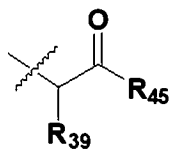
$R_{35}$  представляет собой водород или метил;

или  $R_{34}$  и  $R_{35}$ , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют карбоциклическое кольцо, имеющее формулу  $-(CR_{55}R_{41})_b$ , где каждый из  $R_{55}$  и  $R_{41}$  независимо представляет собой водород или  $C_{1-8}$  алкил и  $b$  представляет собой целое число от 3 до 7;

$R_{36}$  представляет собой водород или  $C_{1-8}$  алкил;

$R_{37}$  представляет собой водород,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $C_{6-10}$  арил,  $-X^1$ - $C_{6-10}$  арил,  $-X^1$ -( $C_{3-8}$  карбоцикл),  $C_{3-8}$  гетероцикл или  $-X^1$ -( $C_{3-8}$  гетероцикл);

каждый  $R_{38}$  независимо представляет собой водород, OH,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  карбоцикл или O-( $C_{1-8}$  алкил);



$R_{53}$  представляет собой  $R_{39}$  или  $R_{54}$ ;

$R_{39}$  представляет собой водород,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $-X^1$ - $C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $C_{3-8}$  гетероцикл,  $-X^1$ - $C_{3-8}$  гетероцикл,  $-C_{1-8}$  алкилен- $NH_2$  или  $(CH_2)_2SCH_3$ ;

каждый  $X^1$  независимо представляет собой  $C_{1-10}$  алкилен или  $C_{3-10}$  циклоалкилен;

$R_{44}$  представляет собой водород или  $C_{1-8}$  алкил;

$R_{45}$  представляет собой  $X^3$ - $R_{42}$  или  $NH$ - $R_{19}$ ;

$X^3$  представляет собой O или S;

$R_{19}$  представляет собой водород, OH, аминогруппу,  $C_{1-8}$  алкиламино или  $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ;

$R_{42}$  представляет собой аминогруппу,  $C_{1-6}$  алкиламино или  $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ;

каждый из  $R_{20}$  и  $R_{21}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил, гидроксированный  $C_{6-10}$  арил, полигидроксированный  $C_{6-10}$  арил, 5-12-членный гетероцикл,  $C_{3-8}$  циклоалкил, гидроксированный  $C_{3-8}$  циклоалкил, полигидроксированный  $C_{3-8}$  циклоалкил или боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

$R_{22}$  представляет собой  $-OH$ ,  $-NHR_{23}$ ,  $-COOH$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$  или  $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$ ;

каждый  $R_{23}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил;

$X^2$  представляет собой боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

$R_{77}$  представляет собой водород или  $X^2$  и  $NR_{77}$  образуют азот-содержащее циклическое соединение;

$R_{82}$  представляет собой  $-NR_{23}$  или кислород;

$R_{54}$  представляет собой  $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{6-10}$  арил,  $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$  гетероцикл или  $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$  карбоцикл;

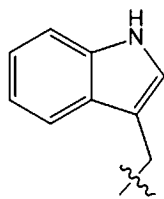
$R_{56}$  независимо представляет собой  $H$ ,  $OH$ ,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $-O-C_{1-8}$  алкил,  $-O-C(O)-R_{29}$  или  $-O-R_{23}-O-C_{1-6}$  алкил- $NH_2$ ;

$R_{29}$  представляет собой аминогруппу, 5-12-членный гетероциклоалкил,  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $R_{28}-C_{5-12}$  гетероциклоалкил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$  или  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $C_{6-12}$  арил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ; или  $R_{29}$  представляет собой  $R_{47}$ , как определено в настоящем описании;

$R_{28}$  отсутствует, представляет собой  $NR_{23}$  или кислород;

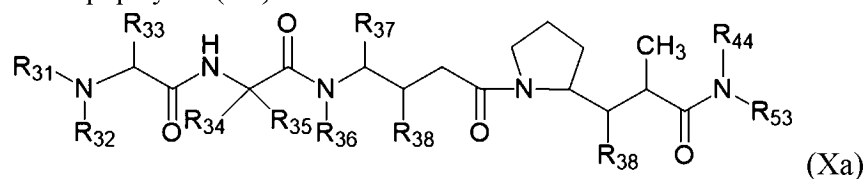
$a$  представляет собой целое число от 1 до 6;  $c$  представляет собой целое число от 0 до 3;  $d$  представляет собой целое число от 1 до 3; и  $f$  представляет собой целое число от 1 до 12.

[356] В некоторых вариантах осуществления в соединении ауристатина формулы (X):



$R_{39}$  представляет собой бензил или ; и  $R_{44}$  представляет собой водород.

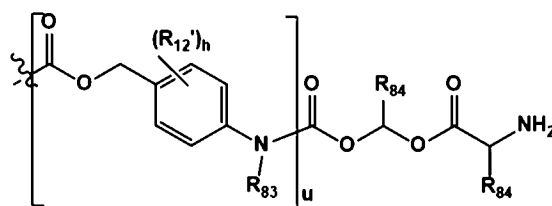
[357] В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой соединение формулы (Xa):



где:

$R_{33}$  по  $R_{38}$ , и  $R_{44}$  являются такими, как определено в настоящем описании,

один из  $R_{31}$  и  $R_{32}$  представляет собой водород или  $C_{1-8}$  алкил, а другой представляет собой:



где:

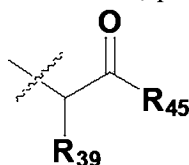
$R_{83}$  представляет собой водород или  $CH_3$ ;

$R_{84}$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил или  $C_{6-10}$  арил;

каждый  $R_{12}'$  независимо представляет собой галоген,  $-C_{1-8}$  алкил,  $-O-C_{1-8}$  алкил, нитро или циано;

$h$  представляет собой целое число от 0 до 4;

$u$  представляет собой целое число, равное 0 или 1;



$R_{53}$  представляет собой  $R_{39}$  или  $R_{54}$ ;

$R_{39}$  представляет собой водород,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $-X^1-C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $C_{3-8}$  гетероцикл,  $-X^1-C_{3-8}$  гетероцикл,  $-C_{1-8}$  алкилен- $NH_2$  или  $(CH_2)_2SCH_3$ ,

каждый  $X^1$  независимо представляет собой  $C_{1-10}$  алкилен или  $C_{3-10}$  циклоалкилен;

$R_{45}$  представляет собой  $X^3-R_{42}$  или  $NH-R_{19}$ ;

$X^3$  представляет собой O или S;

$R_{19}$  представляет собой водород, OH, аминогруппу,  $C_{1-8}$  алкиламино или  $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ;

$R_{42}$  представляет собой водород, аминогруппу,  $C_{1-6}$  алкиламино или  $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ;

каждый из  $R_{20}$  и  $R_{21}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил, гидроксированный  $C_{6-10}$  арил, полигидроксированный  $C_{6-10}$  арил, 5-12-членный гетероцикл,  $C_{3-8}$  циклоалкил, гидроксированный  $C_{3-8}$  циклоалкил, полигидроксированный  $C_{3-8}$  циклоалкил или боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

$R_{22}$  представляет собой  $-OH$ ,  $-NHR_{23}$ ,  $-COOH$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$  или  $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$ ;

каждый  $R_{23}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил;

$X^2$  представляет собой боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

$R_{77}$  представляет собой водород или  $X^2$  и  $NR_{77}$  образуют азот-содержащее циклическое соединение;

$R_{82}$  представляет собой  $-NR_{23}$  или кислород;

$R_{54}$  представляет собой  $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{6-10}$  арил,  $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$  гетероцикл

или  $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$  карбоцикл;

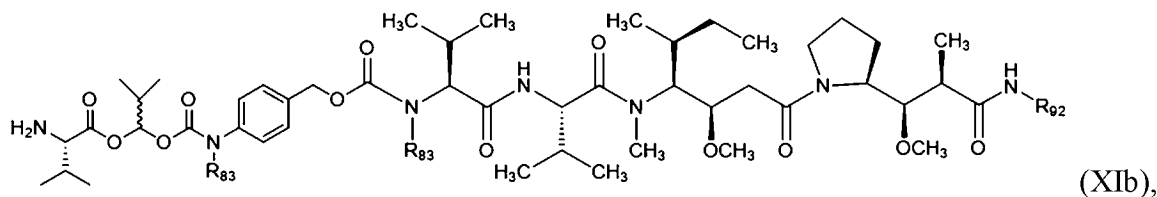
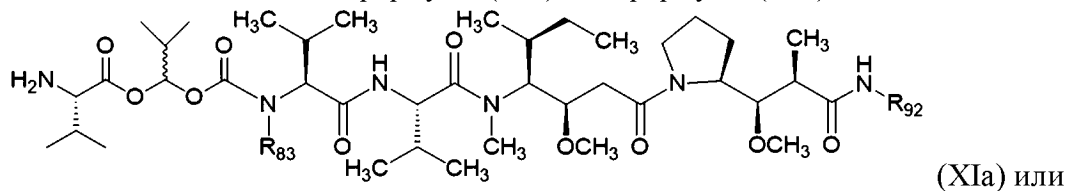
$R_{56}$  независимо представляет собой водород, OH,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  карбоцикл,  $-O-C_{1-8}$  алкил,  $-O-C(O)-R_{29}$  или  $-O-R_{23}-O-C_{1-6}$  алкил- $NH_2$ ;

$R_{29}$  представляет собой аминогруппу, 5-12-членный гетероциклоалкил,  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $R_{28}-C_{5-12}$  гетероциклоалкил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$  или  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $C_{6-12}$  арил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ; или  $R_{29}$  представляет собой  $R_{47}$ , как определено в настоящем описании;

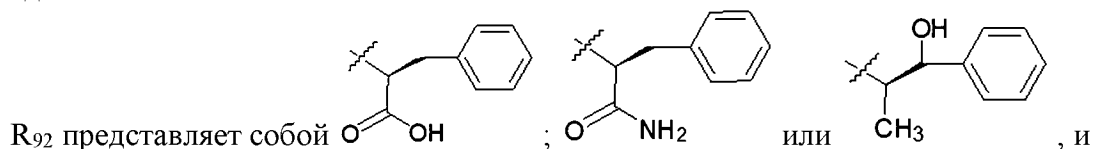
$R_{28}$  отсутствует, представляет собой  $NR_{23}$  или кислород;

a представляет собой целое число от 1 до 6; с представляет собой целое число от 0 до 3; d представляет собой целое число от 1 до 3; и f представляет собой целое число от 1 до 12.

**[358]** В некоторых вариантах осуществления соединения ауристатина формулы (Xa) представляет собой соединение формулы (XIa) или формулы (XIb):



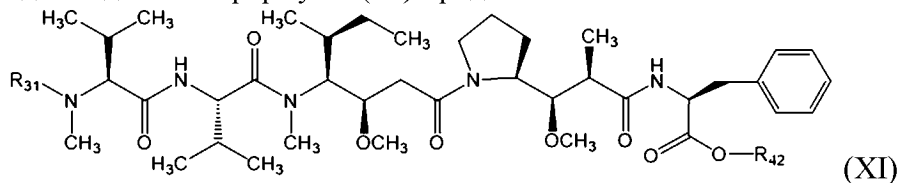
где:



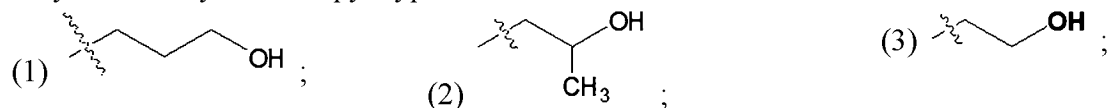
$R_{83}$  представляет собой водород или  $CH_3$ .

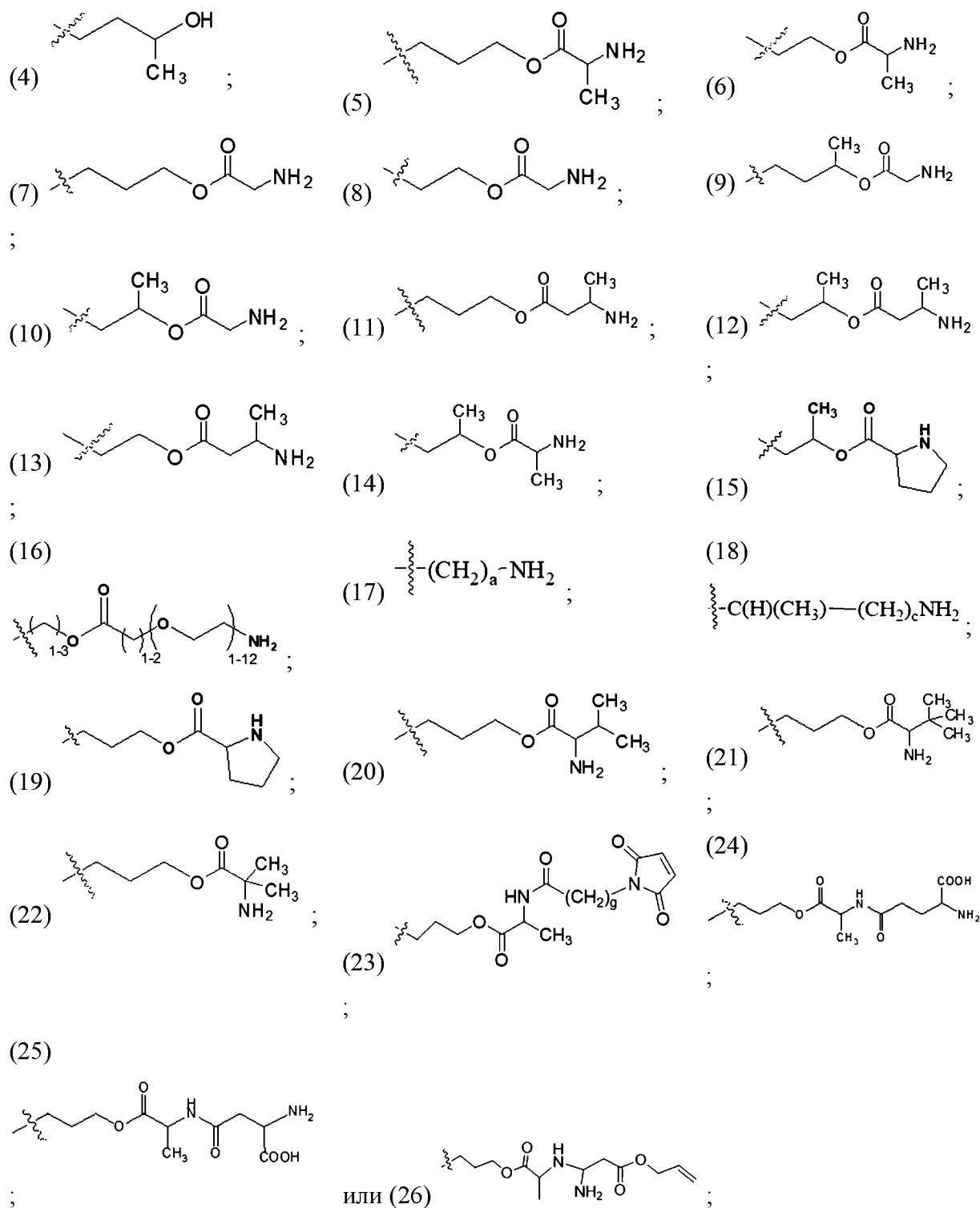
**[359]** В некоторых вариантах осуществления ауристатин формулы (X) представляет собой соединение формулы (XI), формулы (XII) или формулы (XIII):

где соединение формулы (XI) представляет собой:



где  $R_{31}$  представляет собой водород или  $CH_3$  и  $R_{42}$  представляет собой  $-CH_3$  или любую из следующих структур:

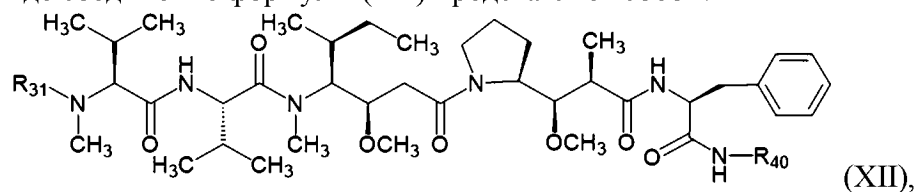




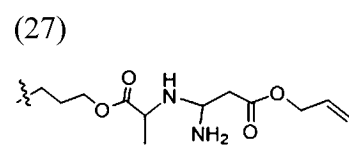
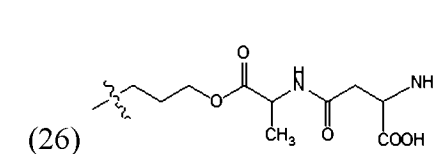
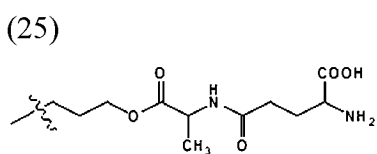
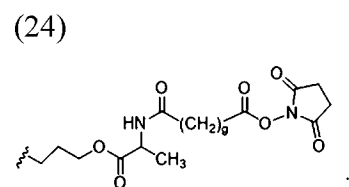
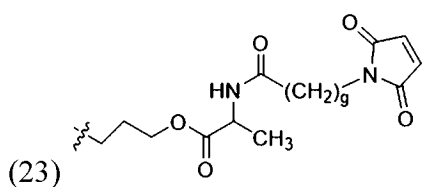
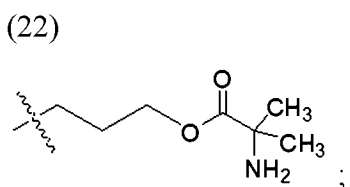
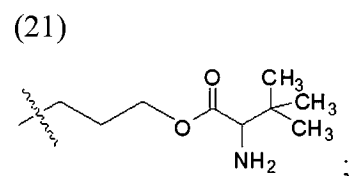
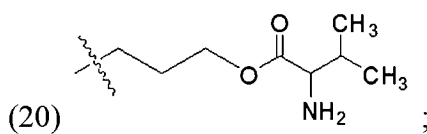
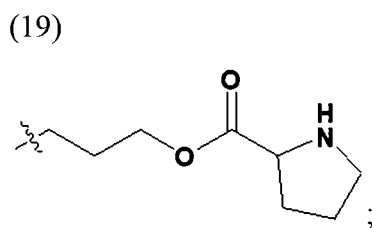
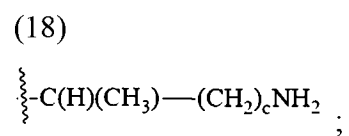
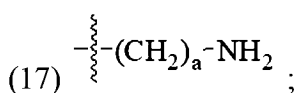
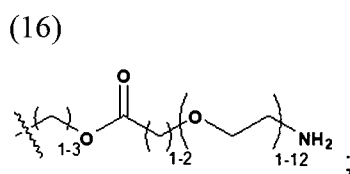
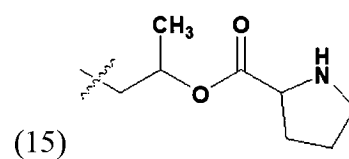
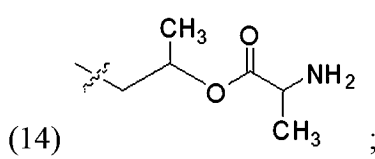
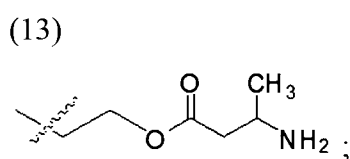
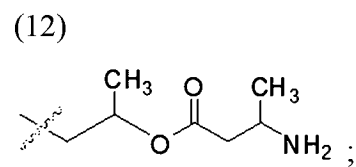
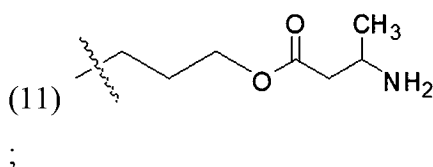
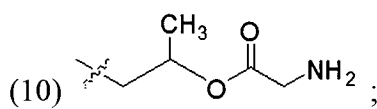
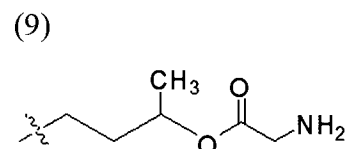
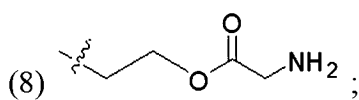
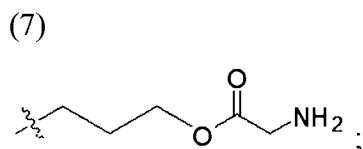
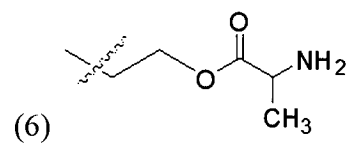
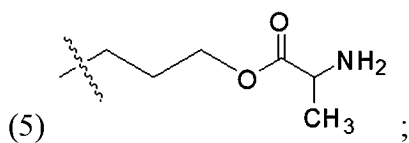
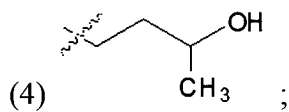
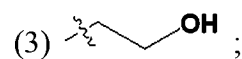
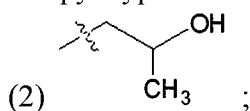
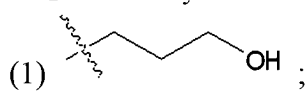
где:

a представляет собой целое число от 1 до 6; c представляет собой целое число от 0 до 3; и g представляет собой целое число от 2 до 6;

где соединение формулы (XII) представляет собой:



где  $R_{31}$  представляет собой водород или  $CH_3$  и  $R_{40}$  представляет собой водород,  $-OH$ ,  $-NH_2$  или любую из следующих структур:



;

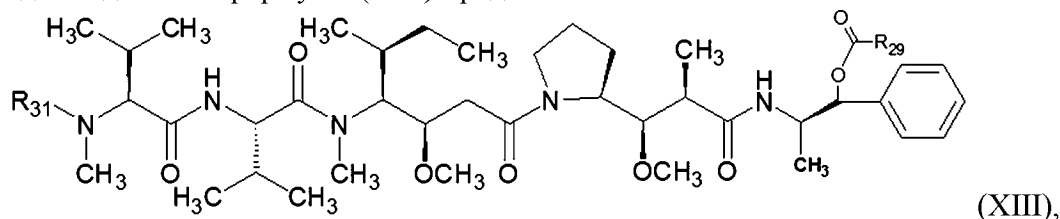
ИЛИ



где:

a представляет собой целое число от 1 до 6; g представляет собой целое число от 2 до 6; и с представляет собой целое число от 0 до 3;

где соединение формулы (XIII) представляет собой:



где:

$R_{31}$  представляет собой водород или  $CH_3$ ;

$R_{29}$  представляет собой аминогруппу, 5-12-членный гетероциклоалкил,  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $R_{28}-C_{5-12}$  гетероциклоалкил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $-R_{28}-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$  или  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $C_{6-12}$  арил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ; или  $R_{29}$  представляет собой  $R_{47}$ , как определено в настоящем описании;

каждый из  $R_{20}$  и  $R_{21}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил, гидроксированный  $C_{6-10}$  арил, полигидроксированный  $C_{6-10}$  арил, 5-12-членный гетероцикл,  $C_{3-8}$  циклоалкил, гидроксированный  $C_{3-8}$  циклоалкил, полигидроксированный  $C_{3-8}$  циклоалкил или боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

$R_{22}$  представляет собой  $-OH$ ,  $-NHR_{23}$ ,  $-COOH$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$  или  $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$ ;

каждый  $R_{23}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил;

$X^2$  представляет собой боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

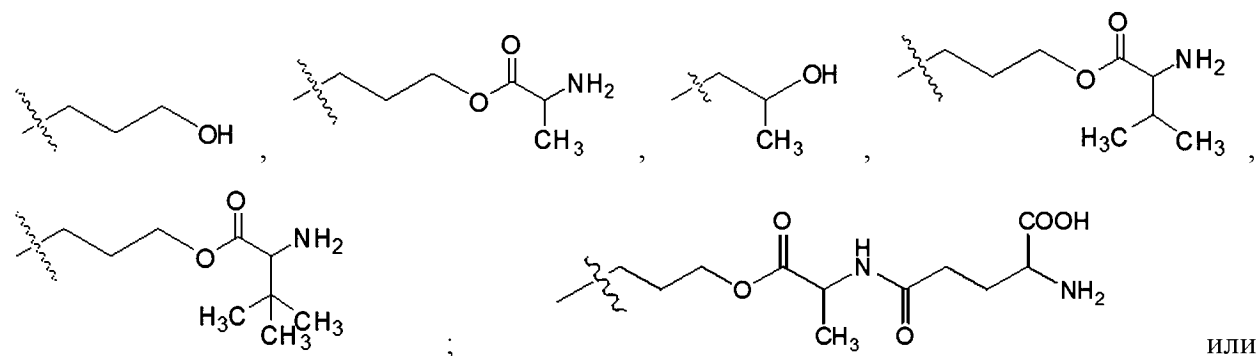
$R_{77}$  представляет собой водород или  $X^2$  и  $NR_{77}$  образуют азот-содержащее циклическое соединение;

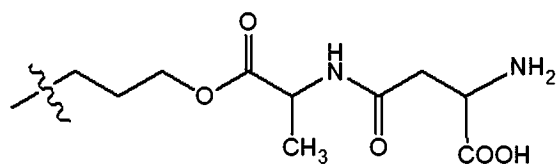
$R_{82}$  представляет собой  $-NR_{23}$  или кислород;

$R_{28}$  отсутствует, представляет собой  $NR_{23}$  или кислород;

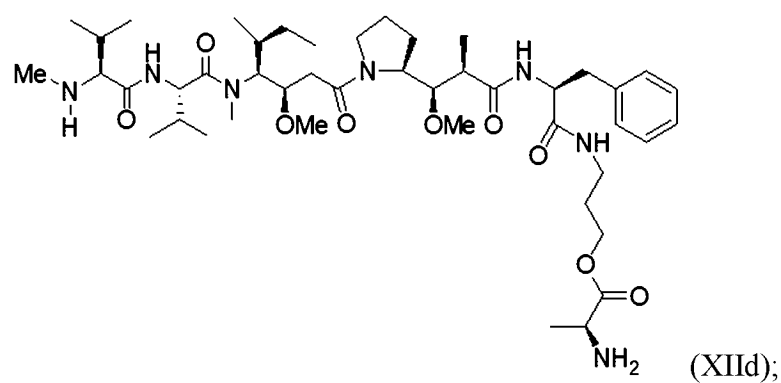
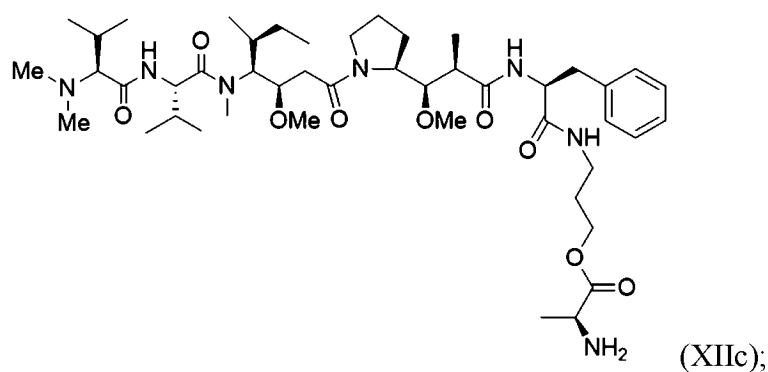
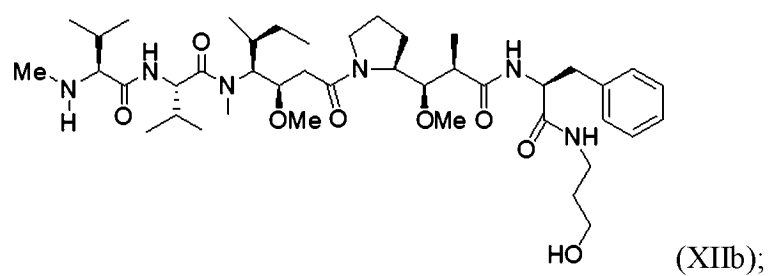
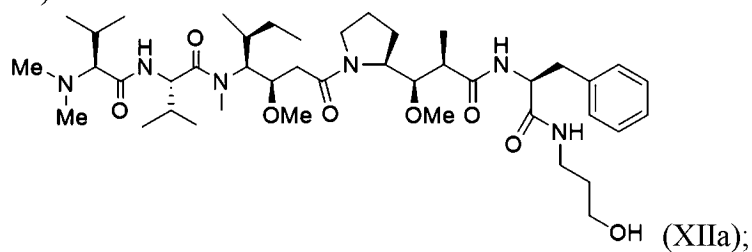
a представляет собой целое число от 1 до 6; с представляет собой целое число от 0 до 3; d представляет собой целое число от 1 до 3; и f представляет собой целое число от 1 до 12.

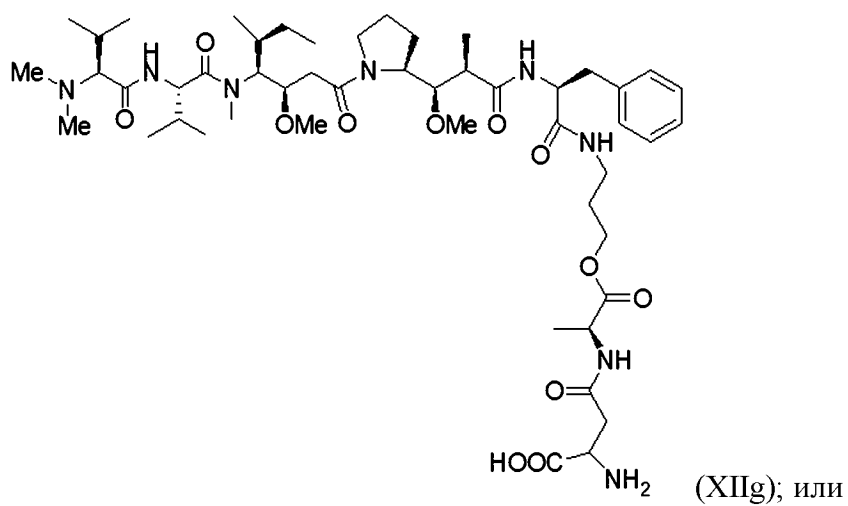
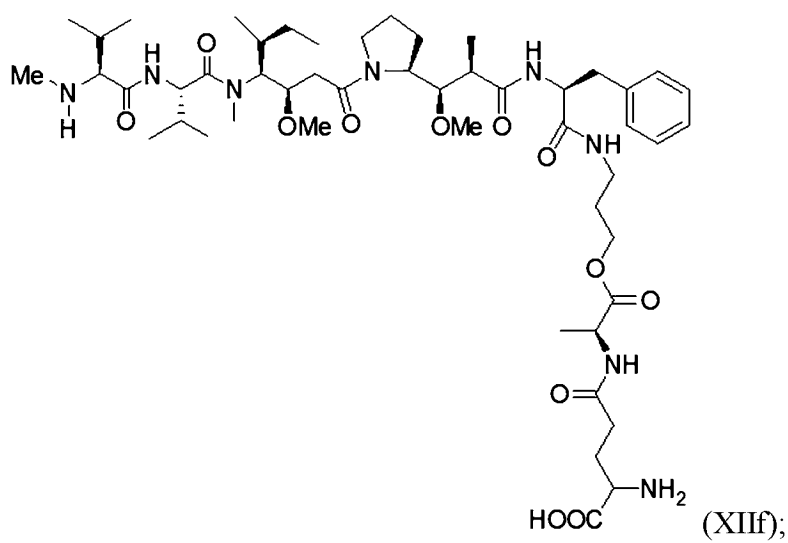
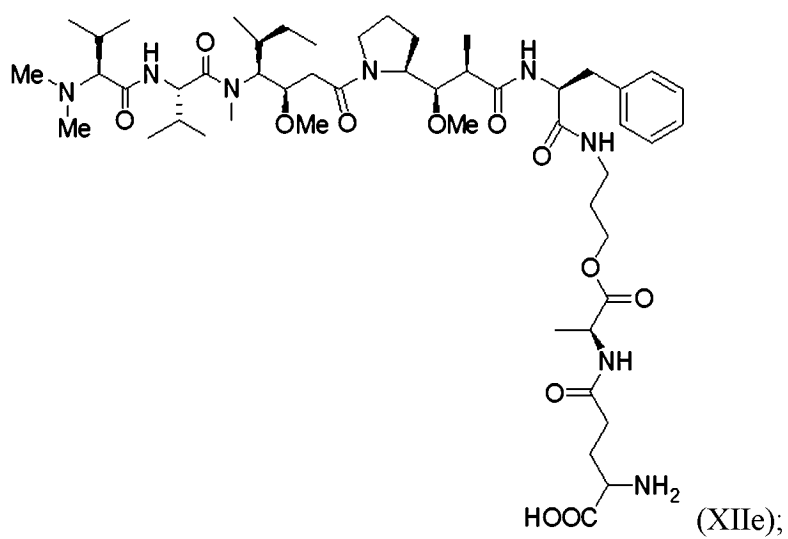
[360] В некоторых вариантах осуществления формулы (XII),  $R_{40}$  представляет собой

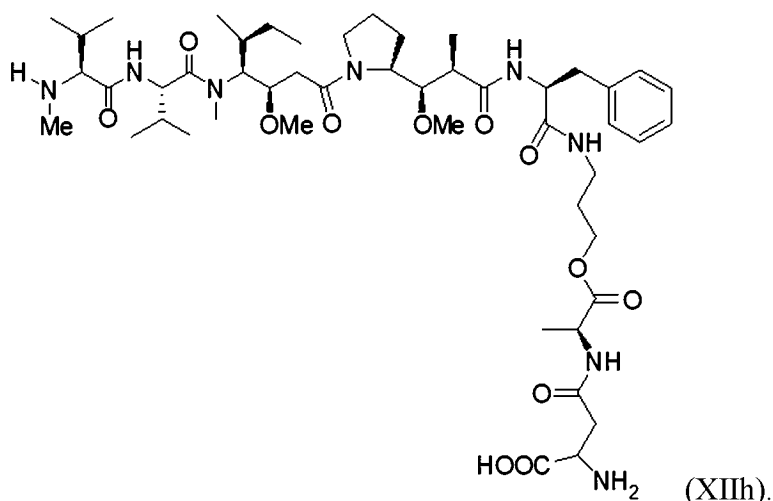




[361] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (XII) представляет собой соединение формулы (XIIa), (XIIb), (XIIc), (XIId), (XIIe), (XIIf), (XIIg) или (XIIh):







[362] В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (XIII),  $R_{29}$  представляет собой  $-NH_2$ , 5-членный гетероциклоалкил,  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ,  $R_{28}-C_{5-12}$  гетероциклоалкил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$  или  $-R_{28}-C_{1-6}$  алкил- $C_{6-12}$  арил- $C_{1-6}$  алкил- $R_{22}$ ; или  $R_{29}$  представляет собой  $R_{47}$ , как определено в настоящем описании;

$R_{28}$  отсутствует, представляет собой  $NR_{23}$  или кислород;

$R_{22}$  представляет собой  $-OH$ ,  $-NHR_{23}$ ,  $-COOH$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ ,  $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$  или  $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$ ;

каждый  $R_{23}$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{6-10}$  арил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $-COOH$  или  $-COO-C_{1-6}$  алкил;

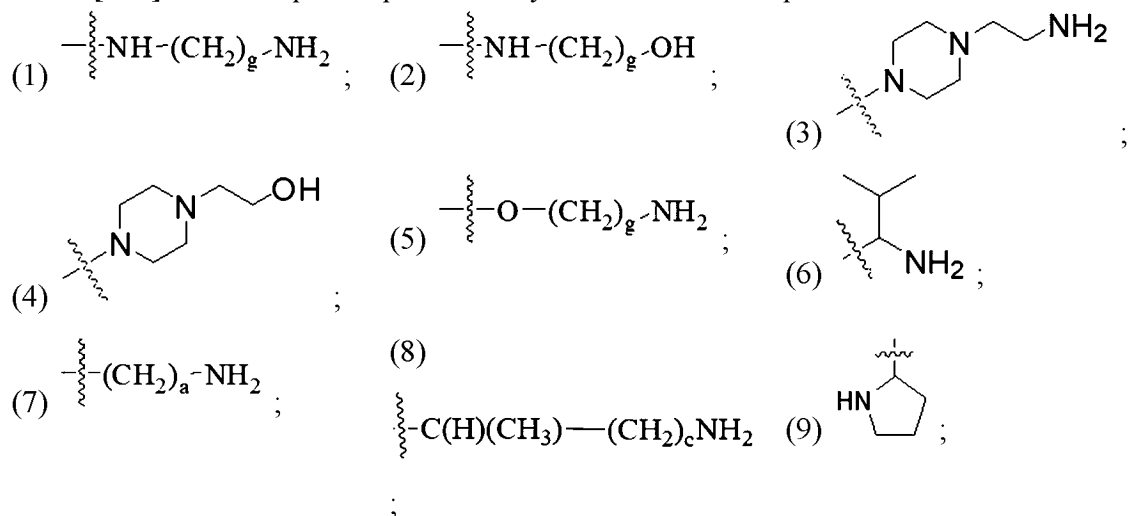
$X^2$  представляет собой боковую цепь природной или не природной аминокислоты;

$R_{77}$  представляет собой водород или  $X^2$  и  $NR_{77}$  образуют азот-содержащее циклическое соединение;

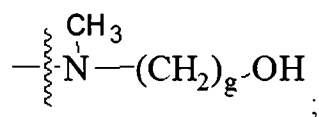
$R_{82}$  представляет собой  $-NR_{23}$  или кислород;

$c$  представляет собой целое число от 0 до 3;  $d$  представляет собой целое число от 1 до 3; и  $f$  представляет собой целое число от 1 до 12.

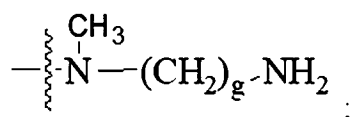
[363] В некоторых вариантах осуществления  $R_{29}$  представляет собой:



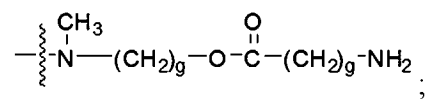
(10)



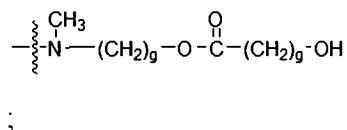
(11)



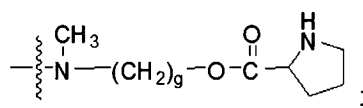
(12)



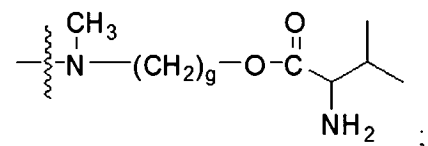
(13)



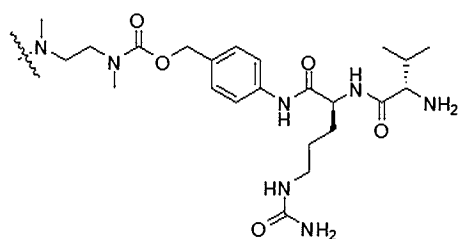
(14)



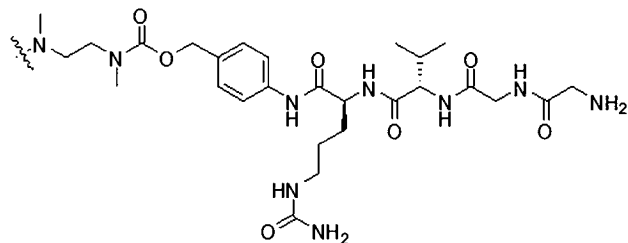
(15)



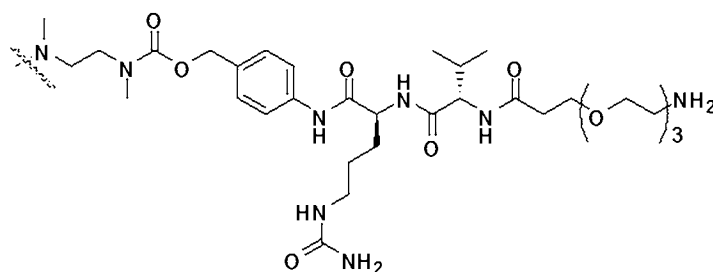
(16)



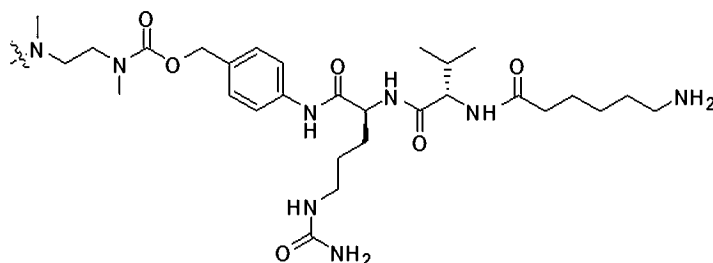
; (17)



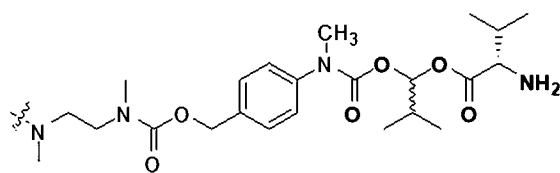
(18)



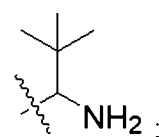
(19)



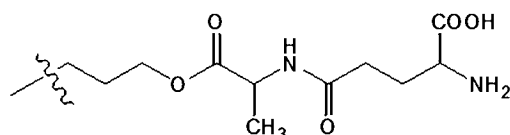
(20)



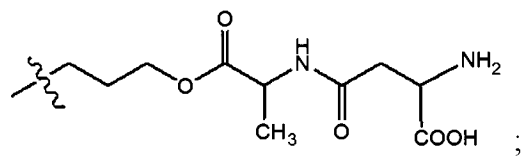
; (21)



(22)

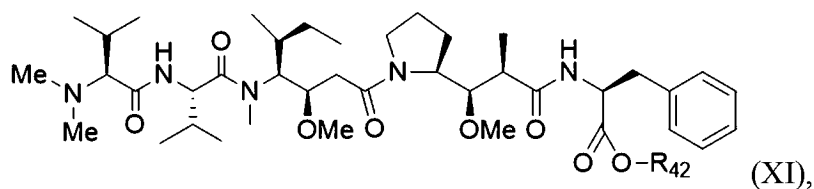


или (23)

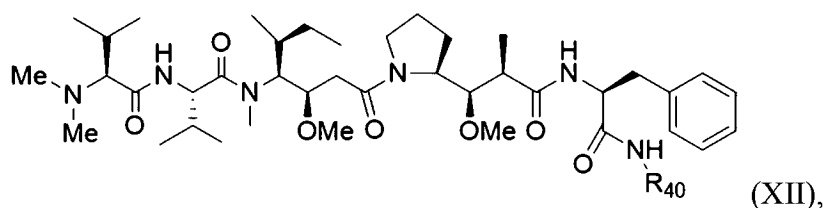


где:

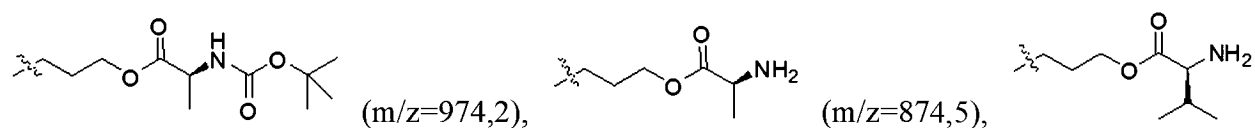
а представляет собой целое число от 1 до 6; с представляет собой целое число от 0 до 3; и g представляет собой целое число от 2 до 6.



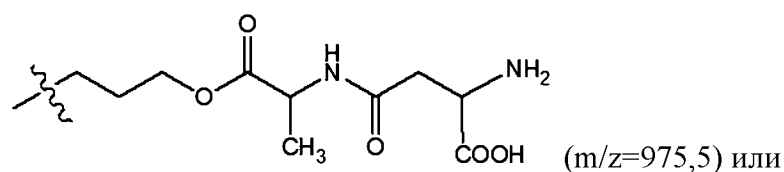
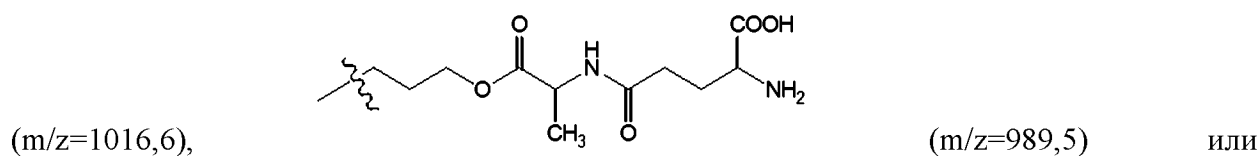
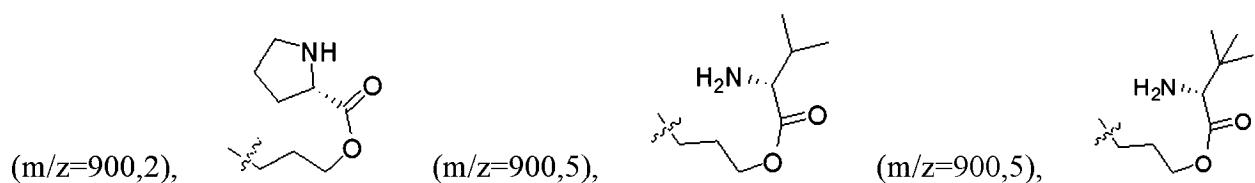
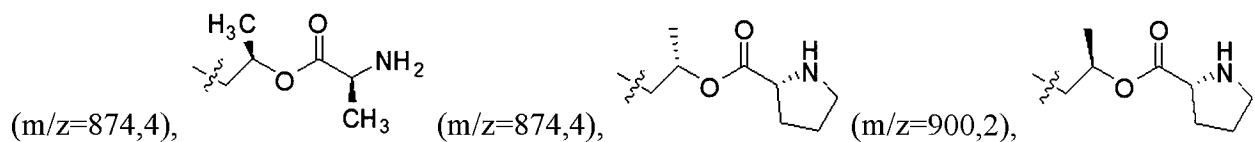
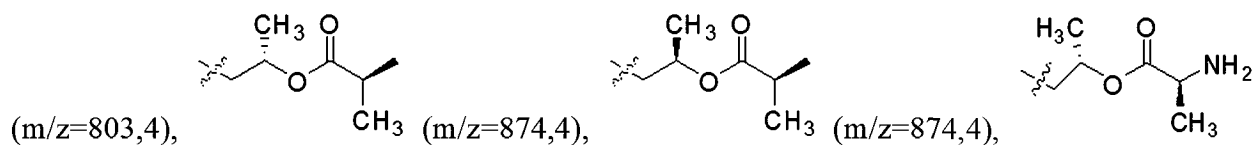
где  $R_{42}$  представляет собой H,  $-CH_3$  ( $m/z=760$ ), ( $m/z=802,6$ ), ( $m/z=790$ ) или ( $m/z=804$ );

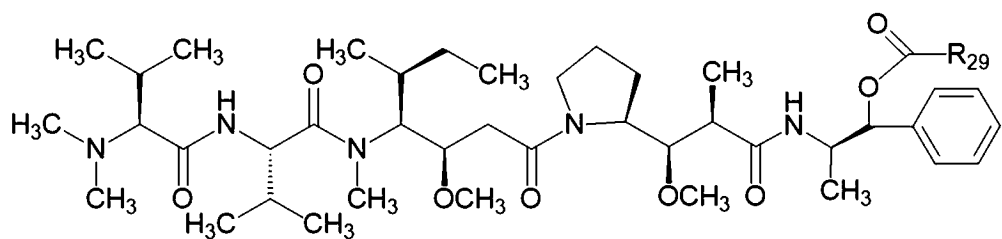


где  $R_{40}$  представляет собой H, ( $m/z=803,5$ ), ( $m/z=789,1$ ),



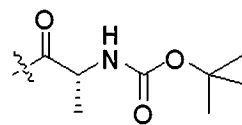
( $m/z=902,2$ ), ( $m/z=874,5$ ), ( $m/z=902,2$ ),  $-OH$  ( $m/z=788$ ), ( $m/z=803,4$ ), ( $m/z=789,1$ ),



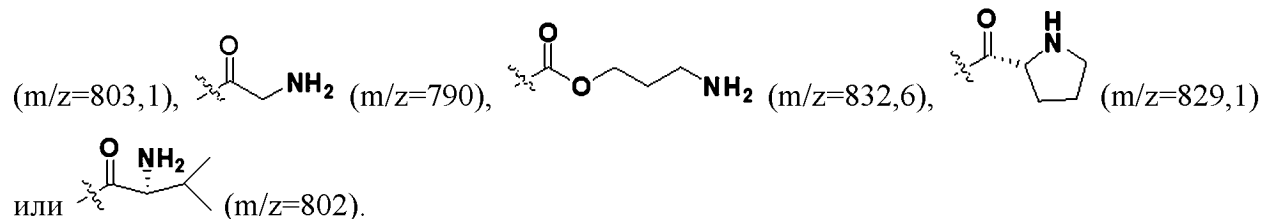
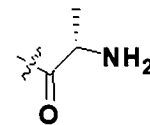


XIII),

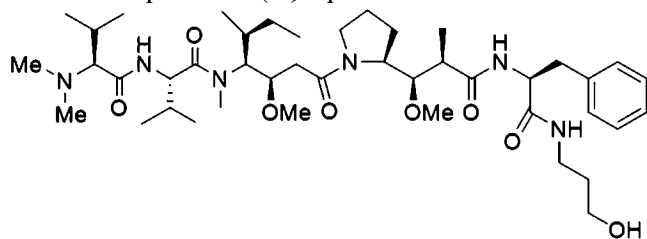
где  $-C(O)-R_{29}$  представляет собой



(m/z=903,2),

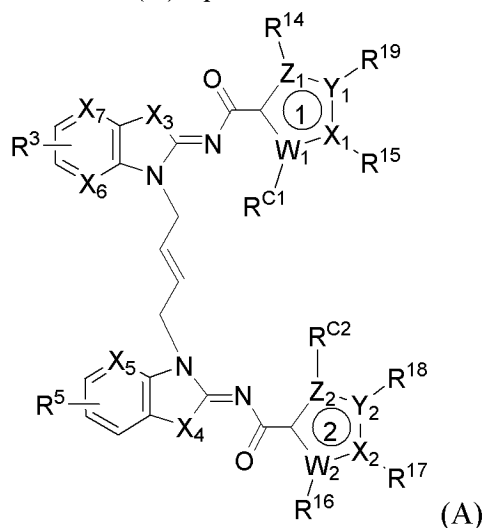


**[364]** В некоторых вариантах осуществления часть цитотоксического лекарственного средства (D) представляет собой:



*Часть лекарственного средства-агониста STING (вариабельный D)*

**[365]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING (D) представляет собой соединение формулы (A):



или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

каждый из  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Z_1$  и  $Z_2$  независимо представляет собой O, S, C или N;

каждый из  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $W_1$  и  $W_2$  независимо представляет собой C или N;

каждый из  $X_3$  и  $X_4$  независимо представляет собой S или  $NR^f$ ;

$X_5$  представляет собой N или  $CR^{A2}$ ;

$X_6$  представляет собой N или  $CR^{A1}$ ;

$X_7$  представляет собой N или  $CR^4$ ;

каждый из  $R^3$  и  $R^5$  независимо представляет собой  $-CON(R^d)(R^f)$ ,  $-CH_2N(R^d)(R^f)$ ,  $-N(R^d)(R^f)$ ,  $-N(R^d)CO(R^f)$ ,  $-CH_2N(R^d)CO(R^f)$ , или один из  $R^3$  и  $R^5$  представляет собой  $-CON(R^d)(R^f)$ ,  $-CH_2N(R^d)(R^f)$ ,  $-N(R^d)(R^f)$ ,  $-N(R^d)CO(R^f)$  или  $-CH_2N(R^d)CO(R^f)$ , а другой из  $R^3$  и  $R^5$  представляет собой H,  $-COOH$  или  $-CO_2(R^C)$ ;

$R^c$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил;

каждый из  $R^{A2}$ ,  $R^{A1}$  и  $R^4$  независимо представляет собой H, галоген, гидроксильную, амино-, амино( $C_{1-4}$  алкил)-, необязательно замещенный ( $C_{1-6}$  алкил) или необязательно замещенный ( $C_{1-6}$  алкил)окси-, где  $C_{1-6}$  алкил указанного необязательно замещенного ( $C_{1-6}$  алкила) или необязательно замещенного ( $C_{1-6}$  алкил)окси- необязательно замещен 1-4 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, включающей гидроксильную,  $C_{1-4}$  алкоксильную,  $-N(R^e)(R^f)$ ,  $-CO_2(R^f)$ ,  $-CON(R^e)(R^f)$  и  $-COOH$ ;

каждый  $R^d$  независимо представляет собой H, гидроксильную или  $C_{1-4}$  алкил;

$R^e$  выбран из H, ( $C_{1-4}$  алкила),  $-CO(C_{1-4}$  алкила),  $-OCO(C_{1-4}$  алкила) и  $-CO_2(C_{1-4}$  алкила);

каждый  $R^f$  независимо представляет собой H, гидроксильную или ( $C_{1-4}$  алкил);

каждый из  $R^{14}$  и  $R^{C2}$  независимо отсутствует или представляет собой  $C_{1-4}$  алкил, где  $C_{1-4}$  алкил необязательно замещен заместителем, выбранным из галогена,  $-OR^c$ ,  $-NR^cR^d$ ,  $-CO_2R^c$ ,  $-CONR^cR^d$ ,  $-SO_2NR^cR^d$  и  $-OCONR^cR^d$ ;

каждый из  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  независимо отсутствует, представляет собой H или  $C_{1-4}$  алкил;

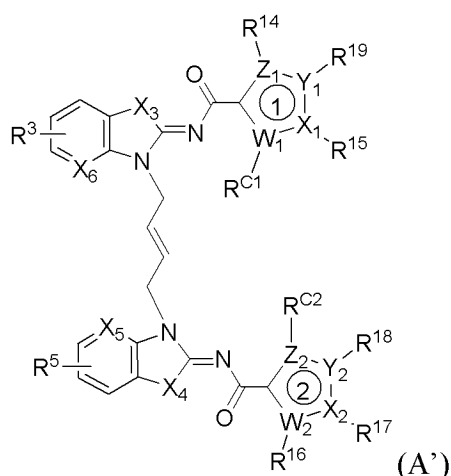
и

каждый из  $R^{15}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$  или  $R^{19}$  независимо отсутствует, представляет собой H или  $C_{1-4}$  алкил, где  $C_{1-4}$  алкил необязательно замещен заместителем, выбранным из галогена,  $-OR^c$ ,  $-NR^cR^d$ ,  $-CO_2R^c$ ,  $-CONR^cR^d$ ,  $-SO_2NR^cR^d$  и  $-OCONR^cR^d$ ;

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  прямо или непрямо соединен с  $L^C$ , когда  $L^C$  присутствует, или с  $A^1$ , когда  $L^C$  отсутствует, через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  прямо или непрямо соединен с  $L^C$ , когда  $L^C$  присутствует, или с  $A^1$ , когда  $L^C$  отсутствует, через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

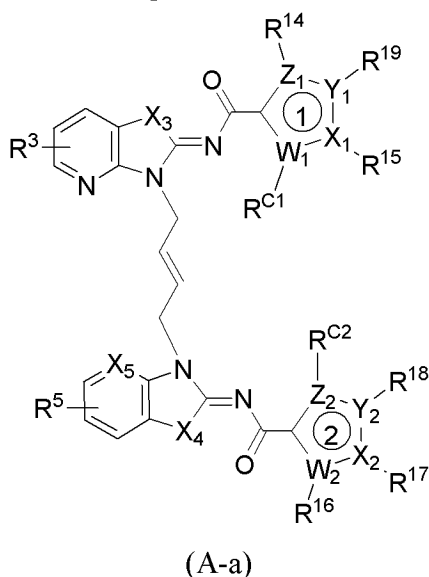
**[366]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING (D) представляет собой соединение формулы (A'):





или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^{A1}$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{C1}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A).

[367] В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-a):



или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{C1}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A);

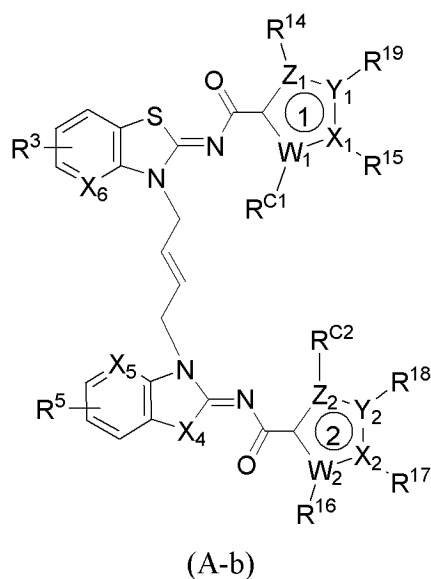
$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

$R^{A2}$  представляет собой галоген, гидроксил, необязательно замещенный ( $C_{1-6}$  алкил), замещенный ( $C_{1-6}$  алкил)окси-, необязательно замещенный ( $C_{1-6}$  алкил)амино- или необязательно замещенный ( $C_{1-6}$  алкил)( $C_{1-4}$  алкил)амино-, где  $C_{1-6}$  алкил указанного необязательно замещенного ( $C_{1-6}$  алкила) или замещенного ( $C_{1-6}$  алкил)окси- необязательно замещен 1-4 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, содержащей гидроксил,  $C_{1-4}$  алкоксил,  $-N(R^e)(R^f)$ ,  $-CO_2(R^f)$ ,  $-CON(R^e)(R^f)$  и  $-COOH$ ;

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей

мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[368]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-b):

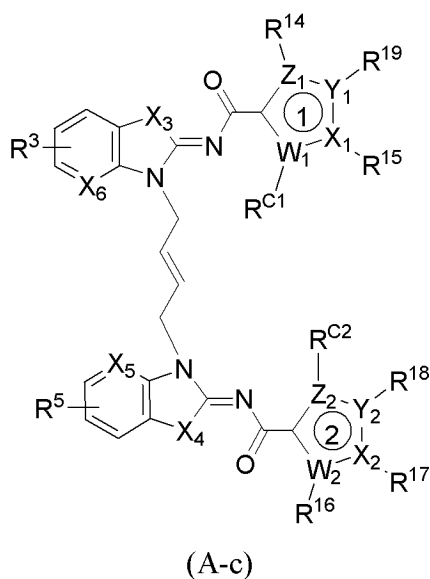


или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, W_1, W_2, X_4, X_5, X_6, R^3, R^5, R^c, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A);

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[369]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-c):



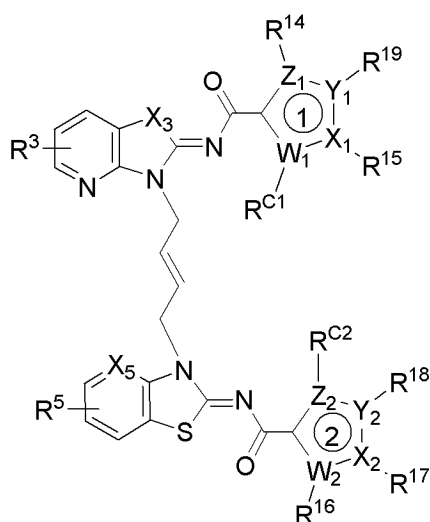
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_2, Z_2, X_2, W_2, X_3, X_4, X_5, R^3, R^5, R^c, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A);

где один из  $W_1, X_1, Y_1$  и  $Z_1$  представляет собой N, а другие  $W_1, X_1, Y_1$  и  $Z_1$  представляют собой O, S или C;

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[370]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-d):



(A-d)

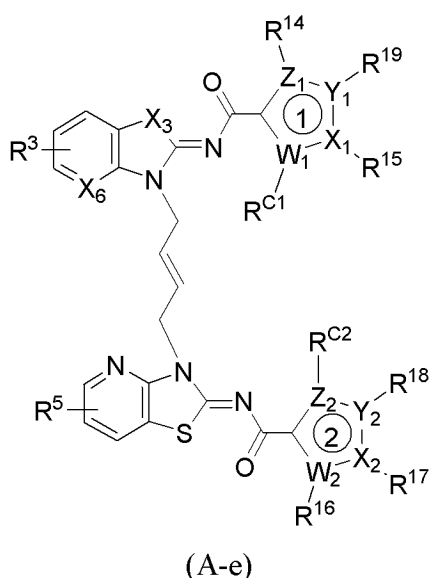
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, W_1, W_2, X_3, R^3, R^5, R^c, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{A2}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[371]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-e):



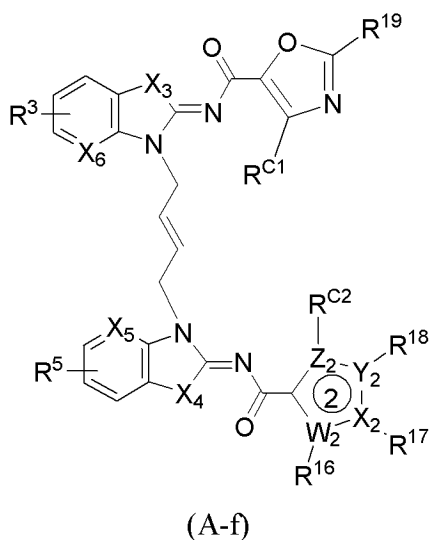
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, X_3, W_1, W_2, R^{A1}, R^3, R^5, R^c, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_6$  представляет собой  $CR^{A1}$ ; и

где (i)  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[372]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f):



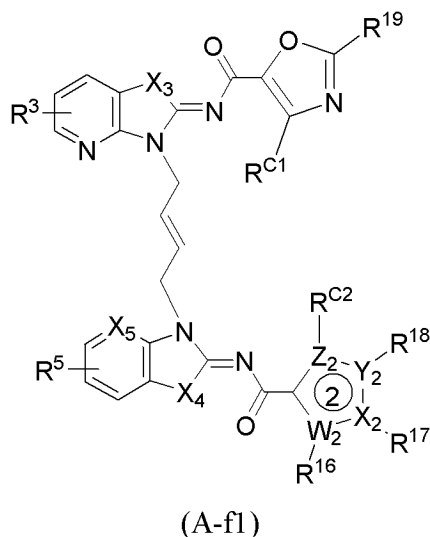
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^c, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C2}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A), и

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один

из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

[373] В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f1):



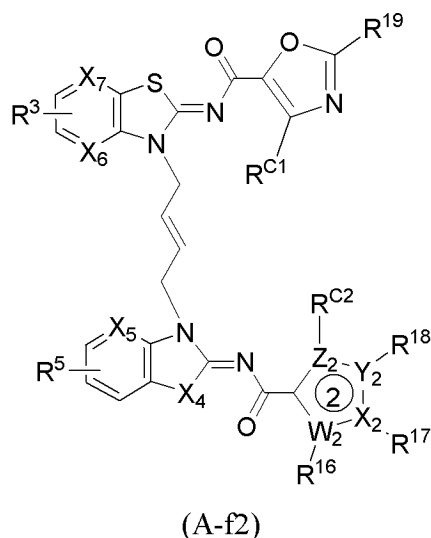
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2, X_3, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^c, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{A2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C2}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

[374] В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f2):

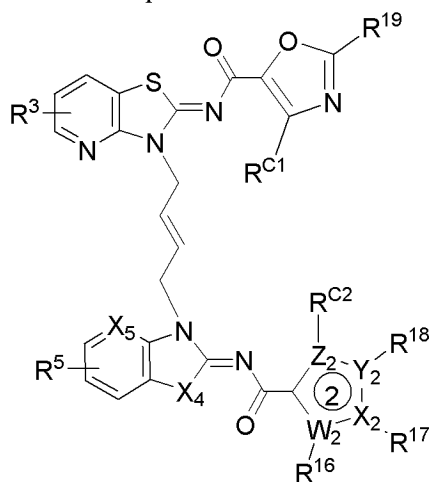


или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_7$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{A1}$ ,  $R^4$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$  и  $R^f$  являются такими, как определено для формулы (A);

где: (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[375]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f3):



(A-f3)

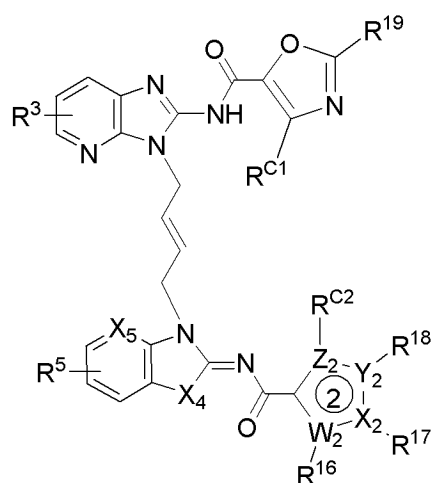
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2$ ,  $X_4$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[376]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f4):



(A-f4)

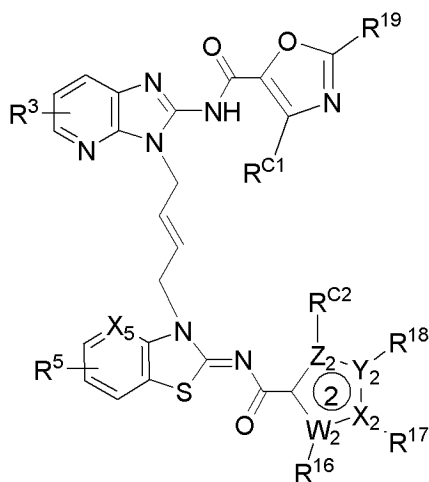
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, W<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, Z<sub>2</sub>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>A2</sup>, R<sup>C2</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup>, R<sup>19</sup> и R<sup>C1</sup> являются такими, как определено для формулы (A);

X<sub>5</sub> представляет собой CR<sup>A2</sup>; и

где (i) R<sup>A2</sup> соединен с L<sup>D</sup> через функциональную группу R<sup>A2</sup>; или (ii) по меньшей мере один из R<sup>C2</sup> и R<sup>C1</sup> присутствует, и где по меньшей мере один из R<sup>C2</sup> и R<sup>C1</sup> соединен с L<sup>D</sup> через по меньшей мере одну функциональную группу R<sup>C2</sup> и/или R<sup>C1</sup>.

[377] В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f5):



(A-f5)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

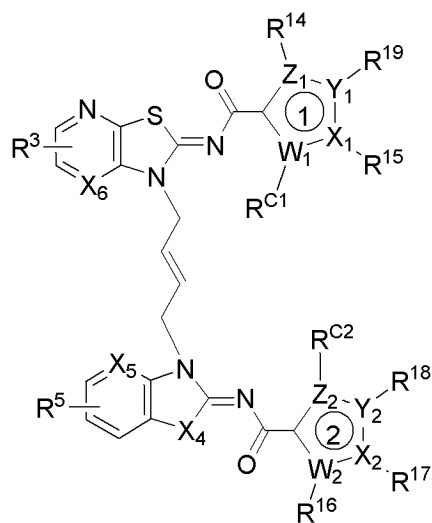
X<sub>2</sub>, W<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, Z<sub>2</sub>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>A2</sup>, R<sup>C2</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup>, R<sup>19</sup> и R<sup>C1</sup> являются такими, как определено для формулы (A);

X<sub>5</sub> представляет собой CR<sup>A2</sup>; и

где (i) R<sup>A2</sup> соединен с L<sup>D</sup> через функциональную группу R<sup>A2</sup>; или (ii) по меньшей

мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

[378] В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f6):



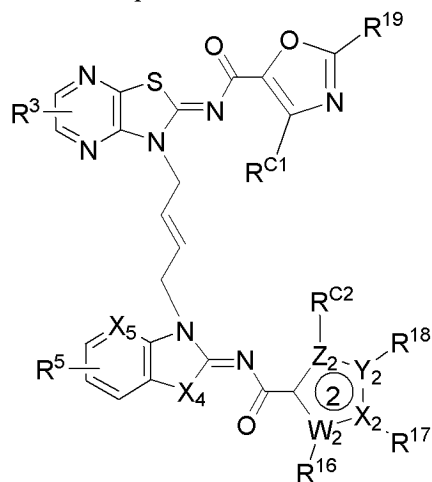
(A-f6)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, W_1, W_2, X_4, X_5, X_6, R^3, R^5, R^c, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A);

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

[379] В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-f7):



(A-f7)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер,



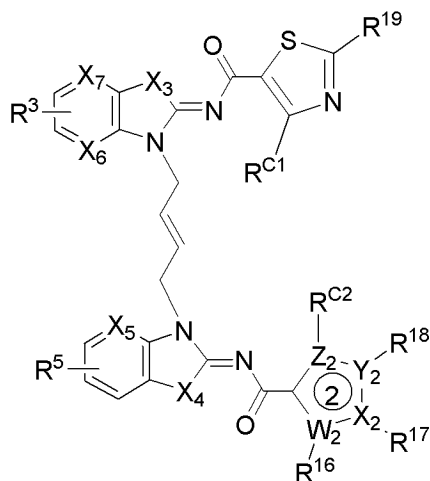
где:

$X_2, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^c, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{A2}, R^{C2}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[380]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g):



(A-g)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

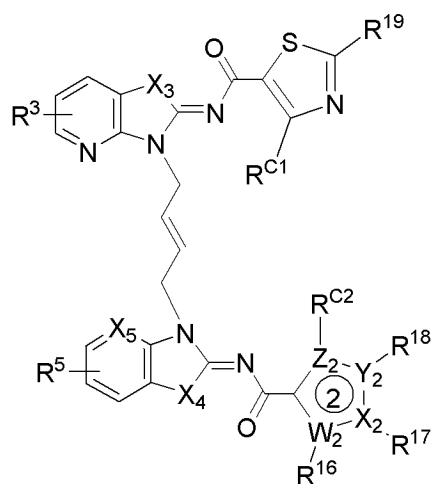
$X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, R^3, R^5, R^c, R^{A2}, R^{A1}, R^4, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^d, R^e, R^f, R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

каждый из  $Y_2$  и  $Z_2$  независимо представляет собой O, S, C или N;

каждый из  $X_2$  и  $W_2$  независимо представляет собой C или N;

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[381]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g1):

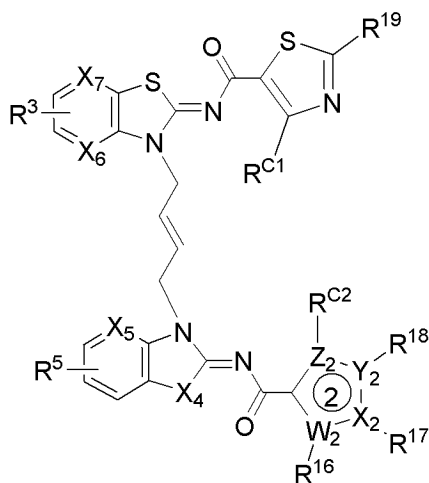


(A-g1)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A); где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[382]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g2):



(A-g2)

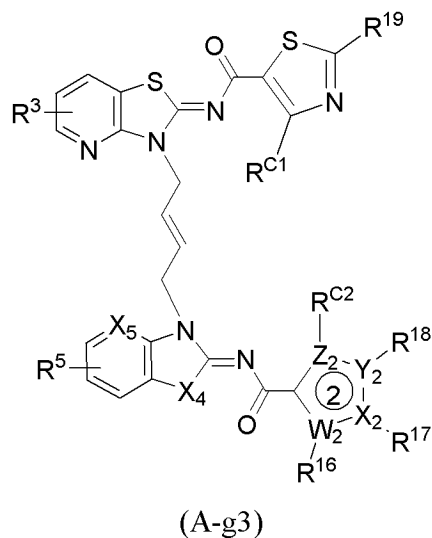
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{A1}$ ,  $R^4$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

где: (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один

из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[383]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g3):



или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер,  
где:

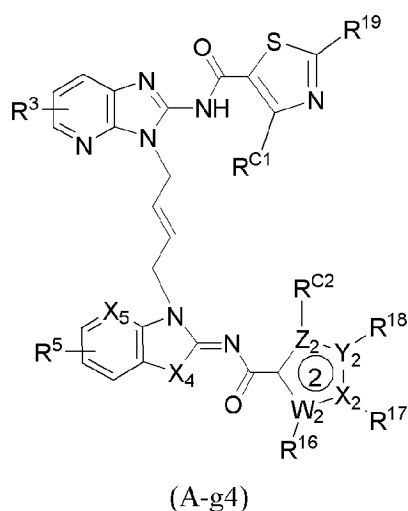
$X_2, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^c, R^{A2}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A_2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ ; и

необязательно, где  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ .

**[384]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g4):



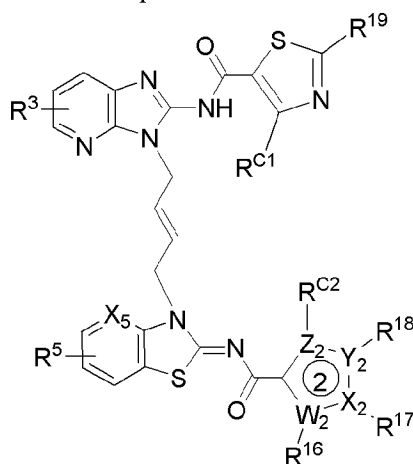
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер,  
где:

$X_2$ ,  $X_4$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[385]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g5):



(A-g5)

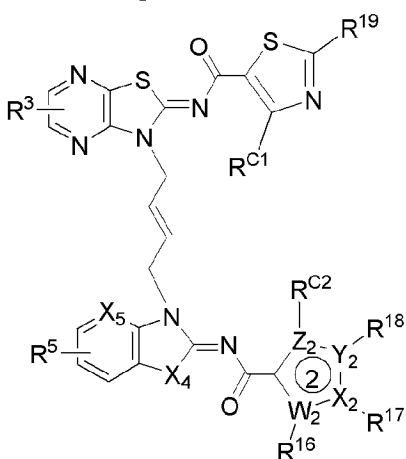
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_2$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где: (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[386]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-g6):



(A-g6)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

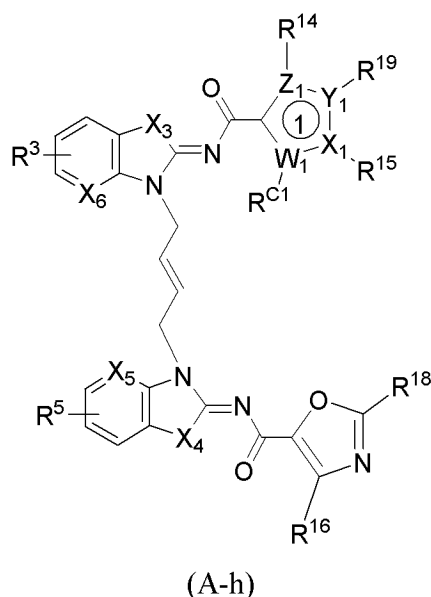
$X_2$ ,  $X_4$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i)  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ ; и

необязательно, где  $R^{A2}$  соединен с  $L^D$  через функциональную группу  $R^{A2}$ .

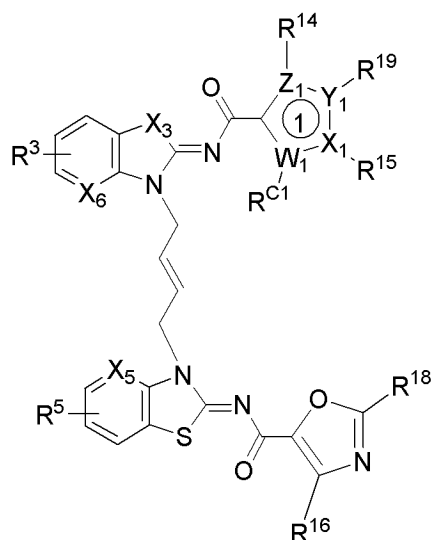
**[387]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-h):



или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_1$ ,  $W_1$ ,  $Y_1$ ,  $Z_1$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{A1}$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A); где: (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[388]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-h1):



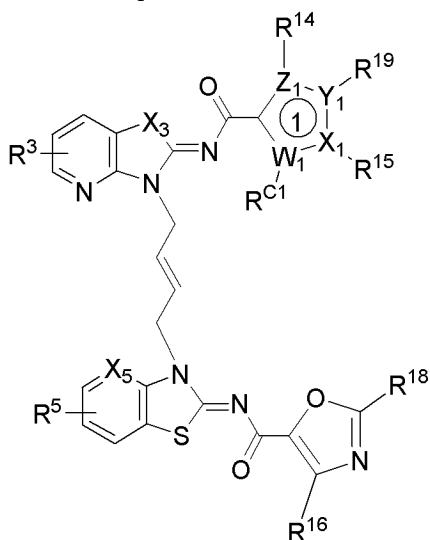
(A-h1)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$X_1$ ,  $X_3$ ,  $W_1$ ,  $Y_1$ ,  $Z_1$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{A1}$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются такими, как определено для формулы (A);

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[389]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING представляет собой соединение формулы (A-h2):



(A-h2)

или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

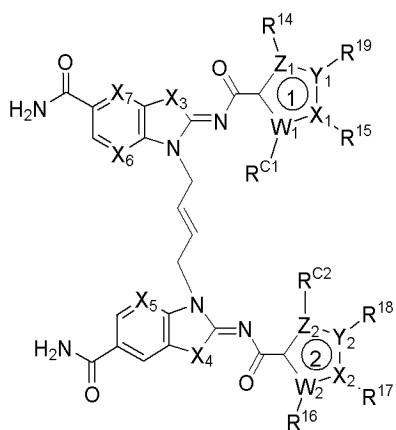
$X_1$ ,  $X_3$ ,  $W_1$ ,  $Y_1$ ,  $Z_1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{16}$  и  $R^{C1}$  являются

такими, как определено для формулы (A);

$X_5$  представляет собой  $CR^{A2}$ ; и

где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

**[390]** В некоторых вариантах осуществления часть лекарственного средства-агониста STING (D) представляет собой соединение формулы (A), имеющее формулу (A-i):



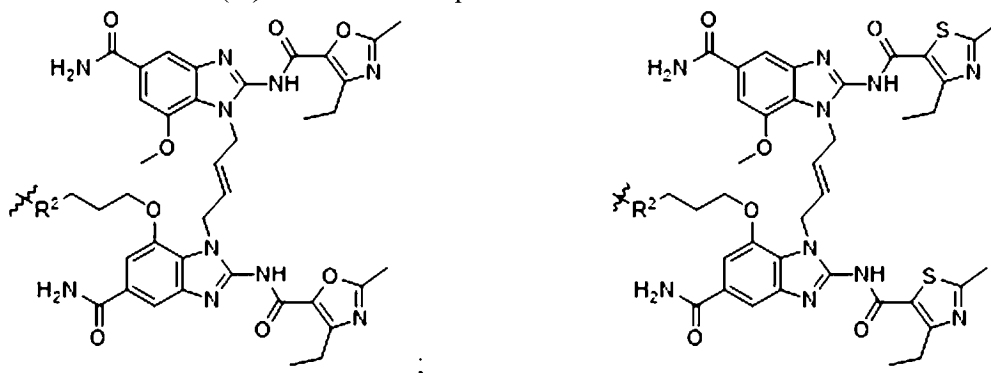
(A-i)

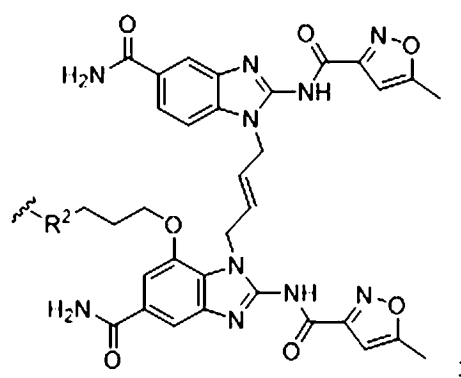
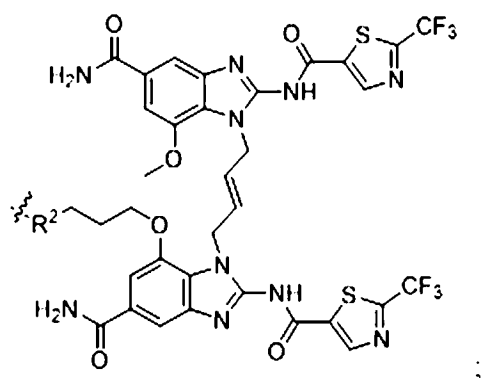
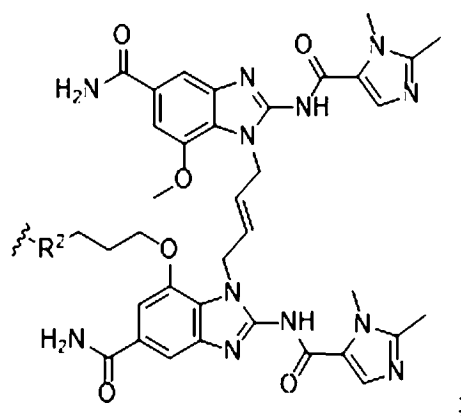
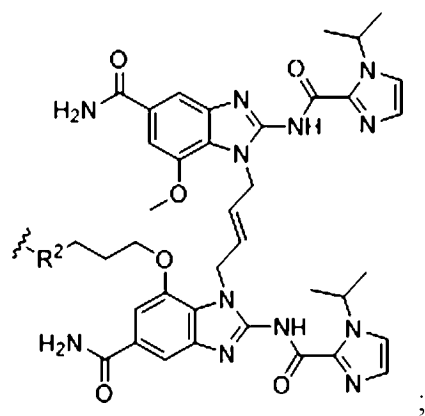
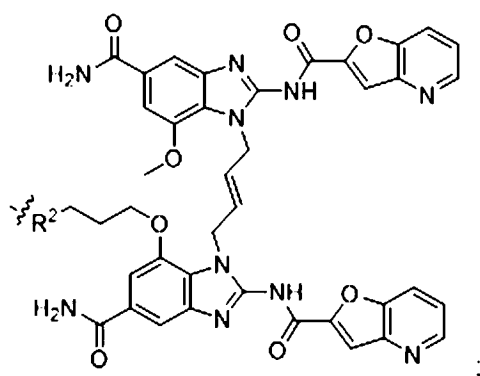
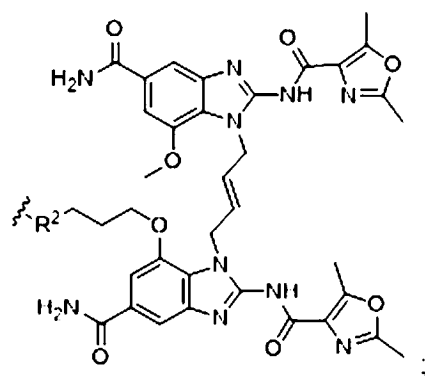
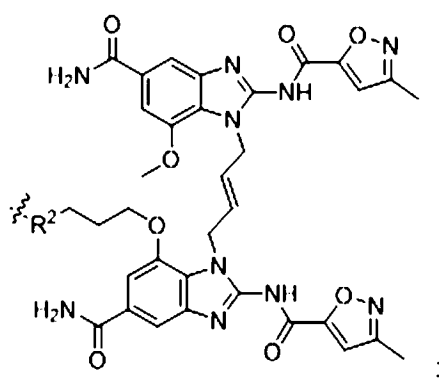
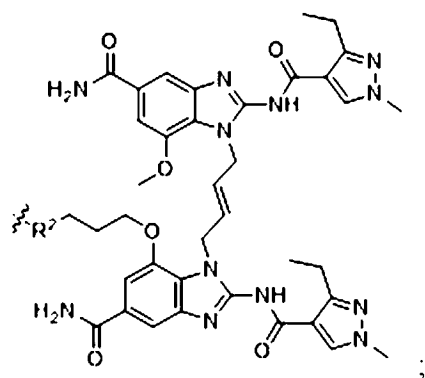
или его пролекарство, сольват, фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где:

$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $R^{A1}$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^4$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$ ,  $R^f$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{C1}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$  и  $R^{19}$  являются такими, как определено для формулы (A); и

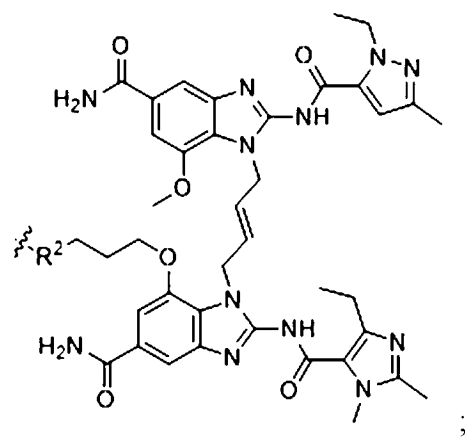
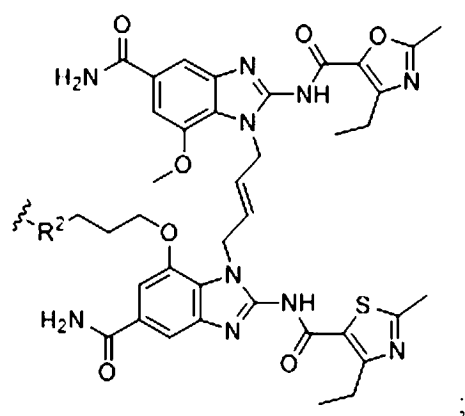
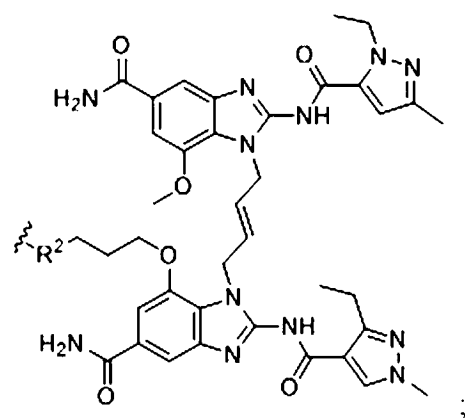
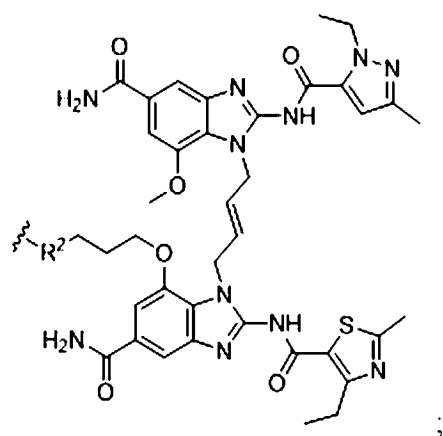
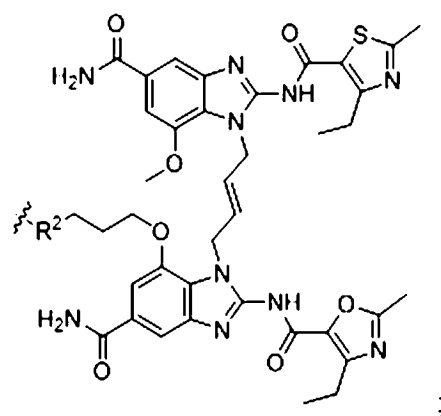
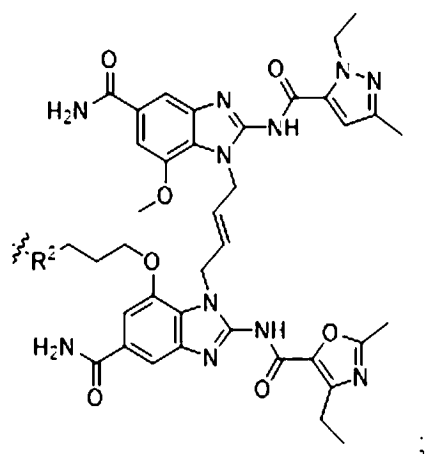
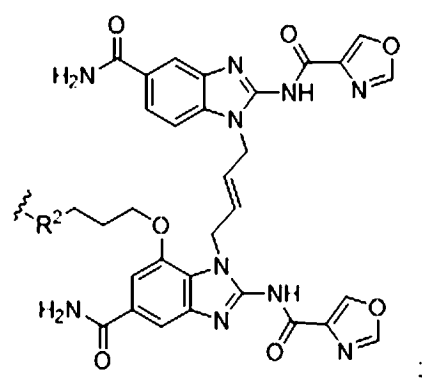
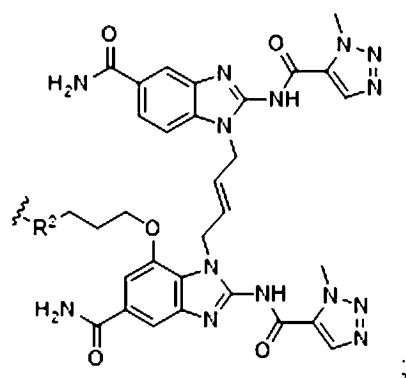
где (i) по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{A2}$  и  $R^{A1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{A2}$  и/или  $R^{A1}$ ; или (ii) по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  присутствует, и где по меньшей мере один из  $R^{C2}$  и  $R^{C1}$  соединен с  $L^D$  через по меньшей мере одну функциональную группу  $R^{C2}$  и/или  $R^{C1}$ .

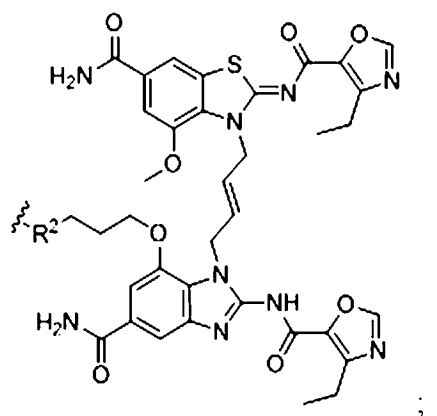
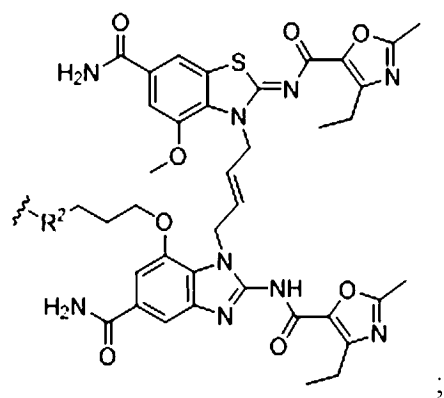
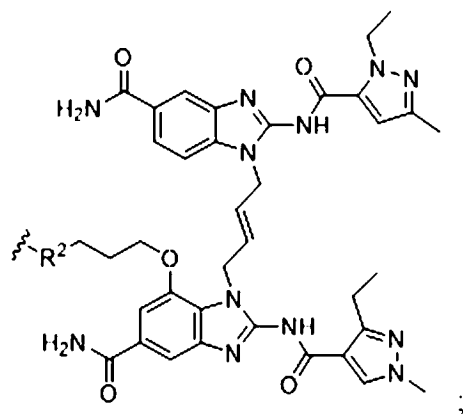
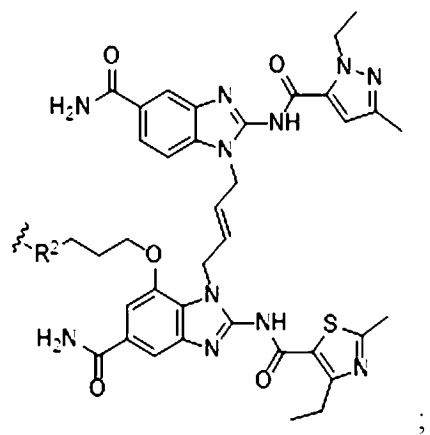
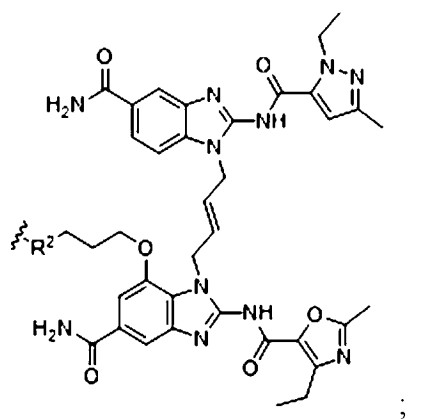
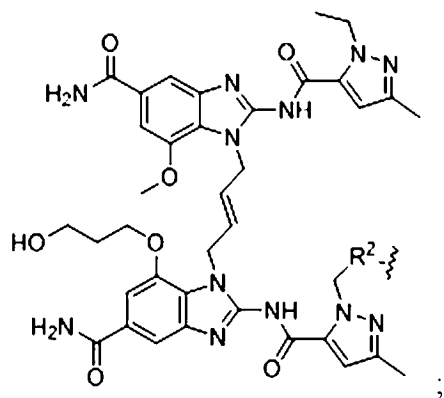
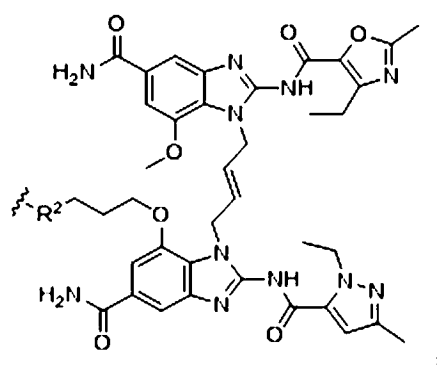
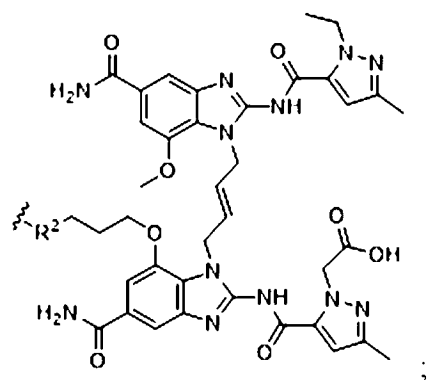
**[391]** В некоторых вариантах осуществления каждая часть лекарственного средства-агониста STING (D) независимо представляет собой:

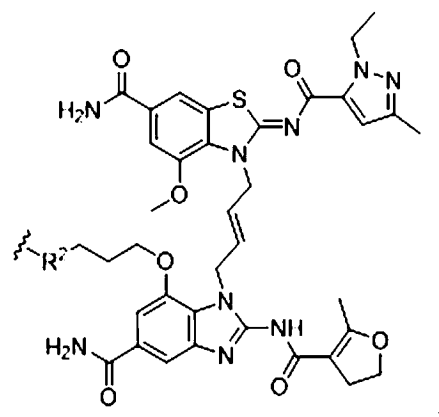
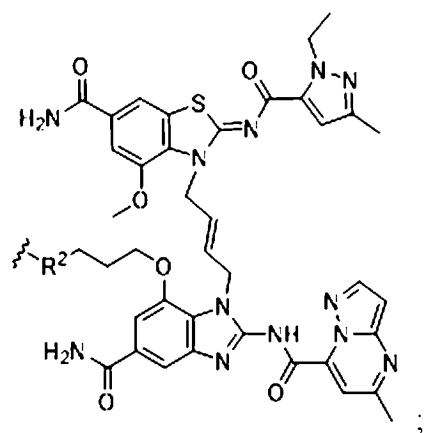
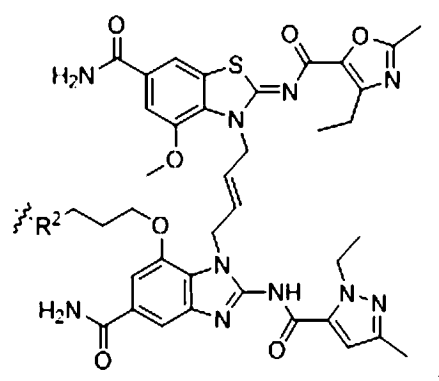
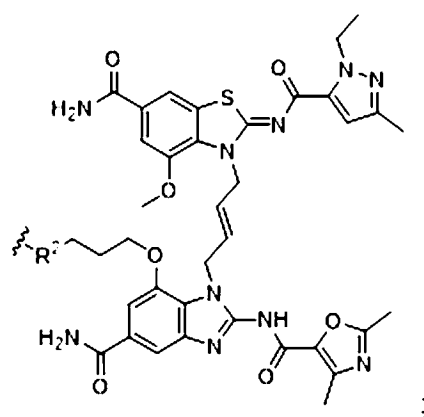
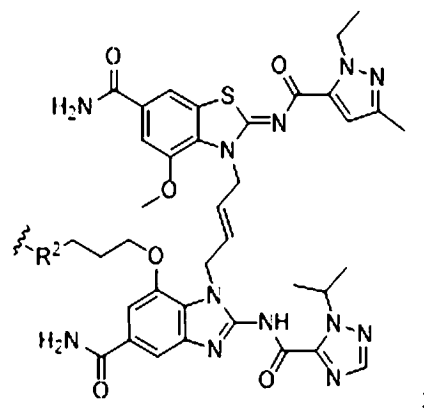
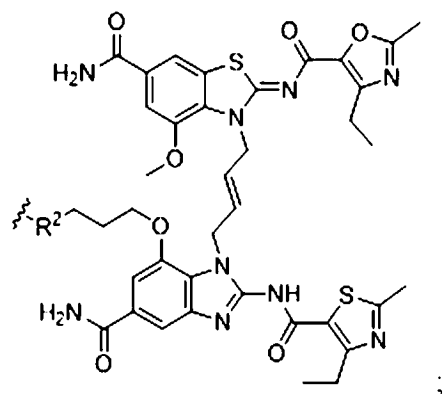
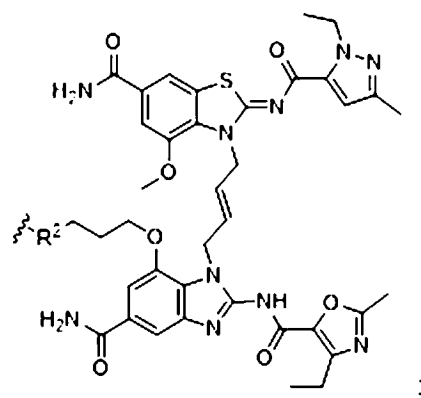
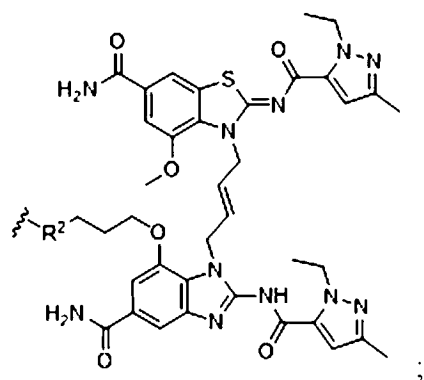


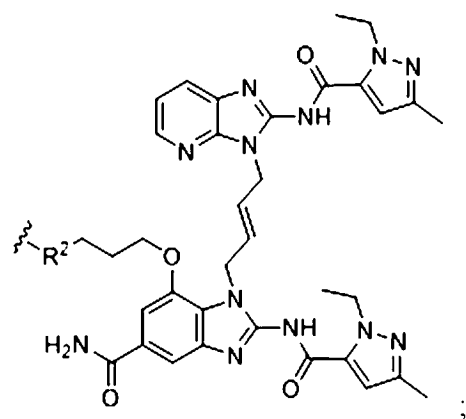
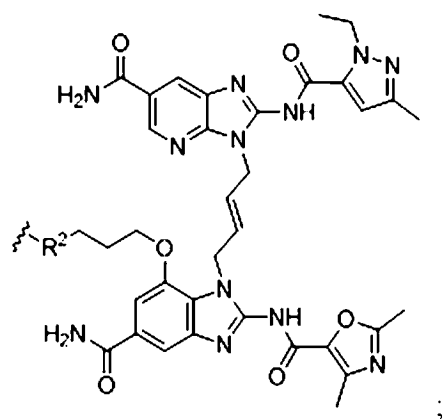
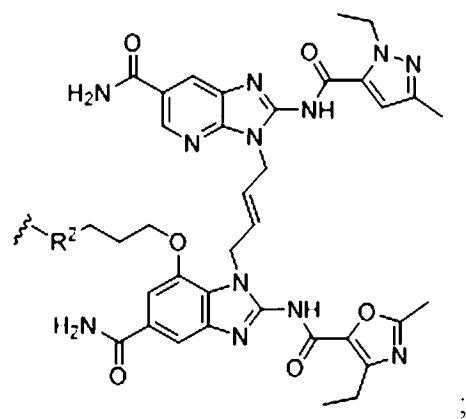
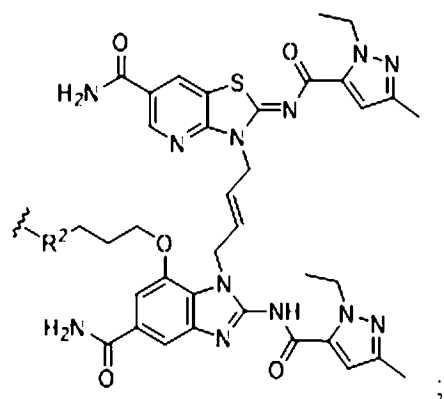
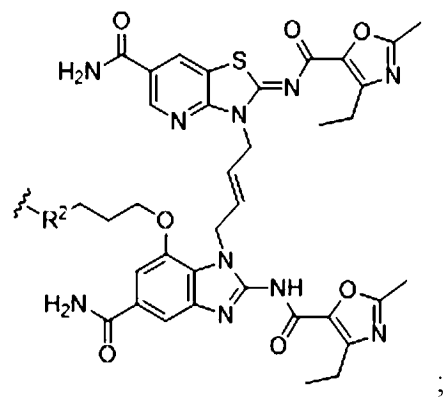
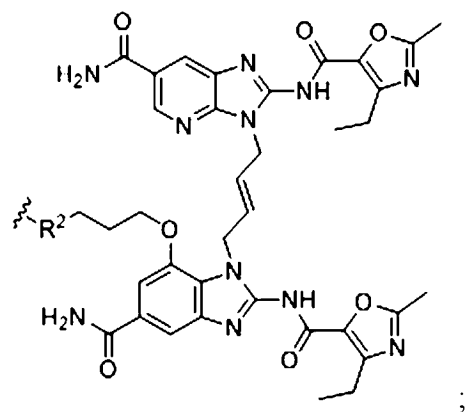
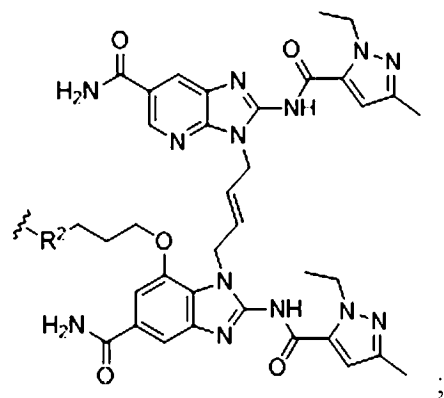
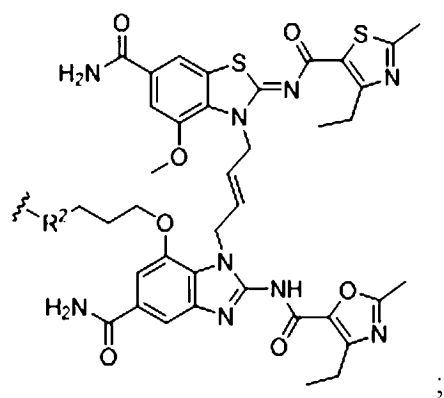


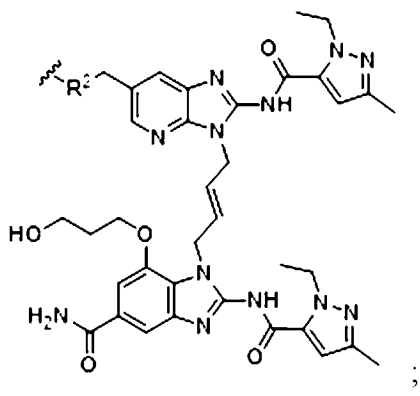
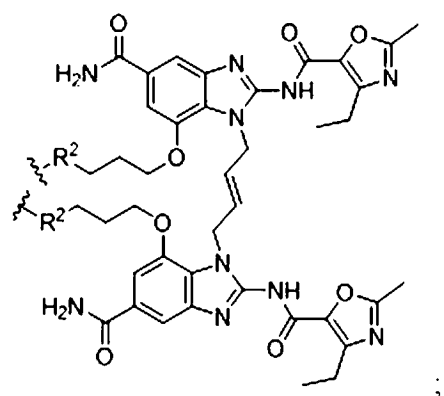
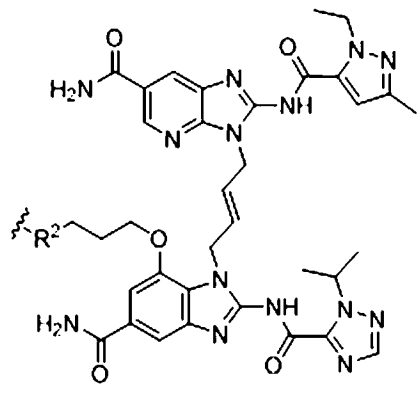
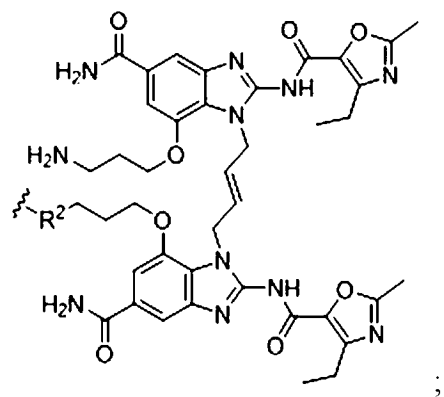
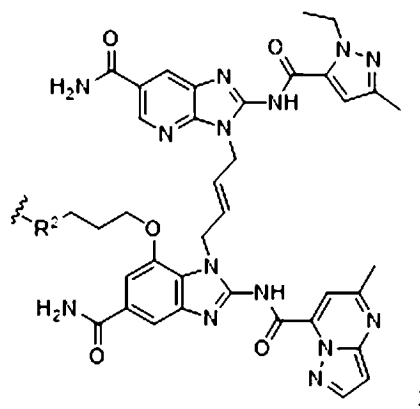
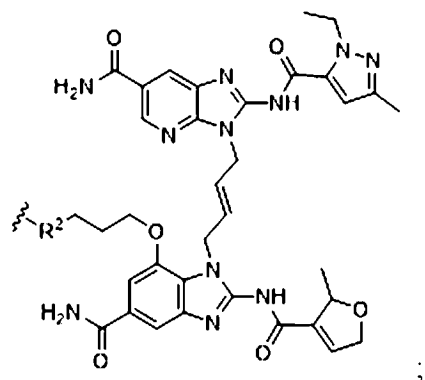
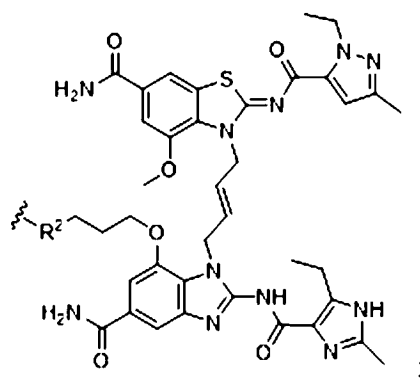
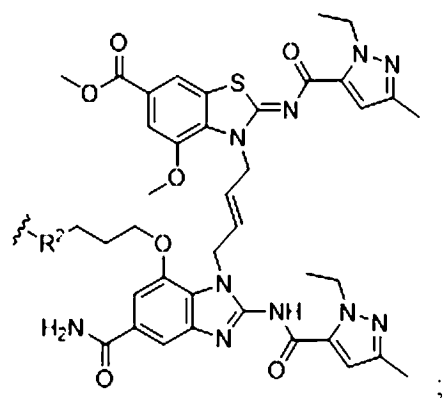


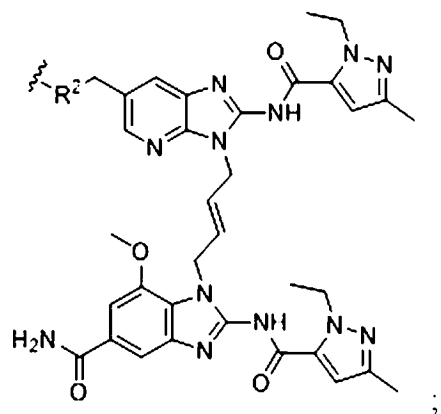
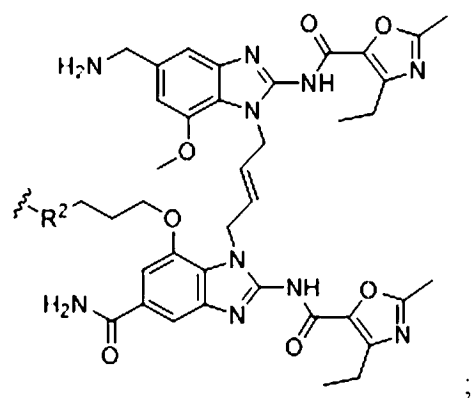
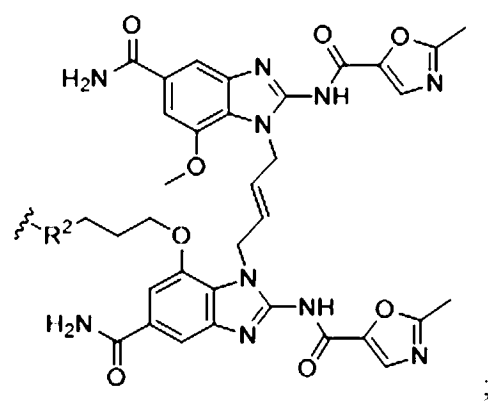
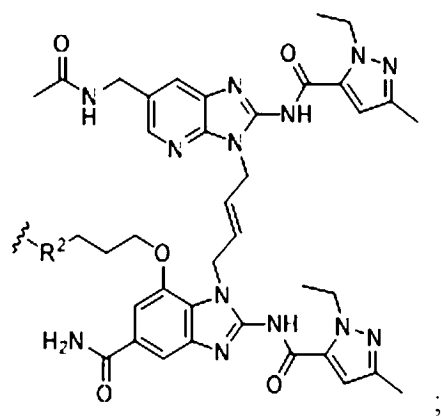
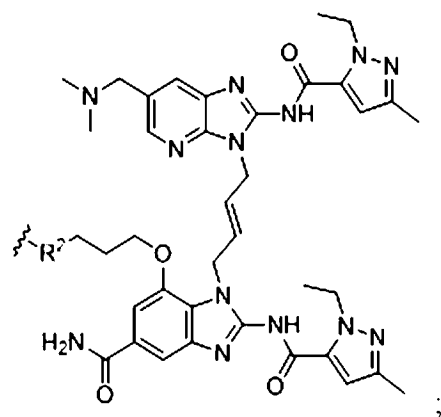
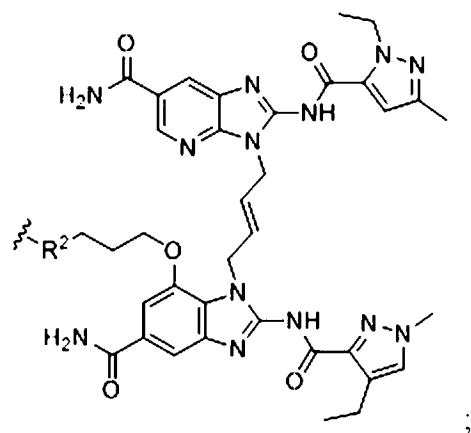
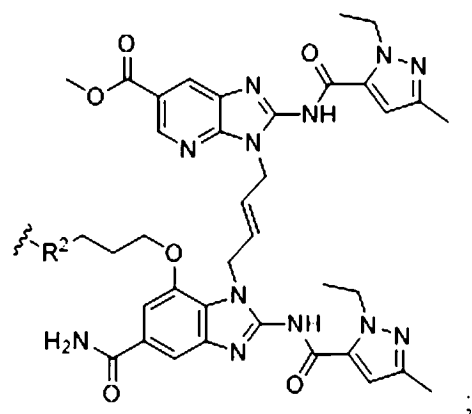
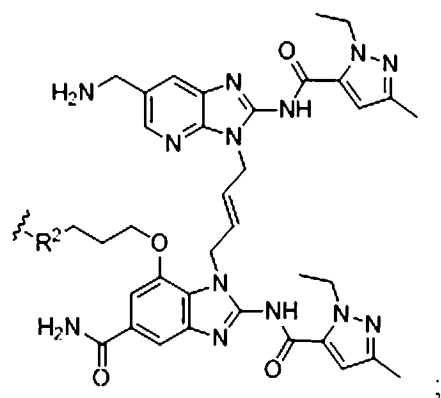


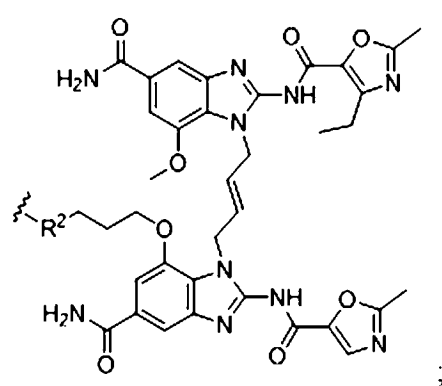
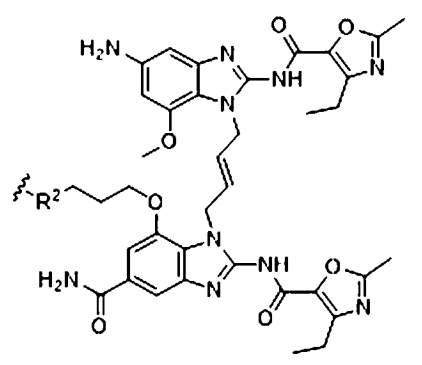
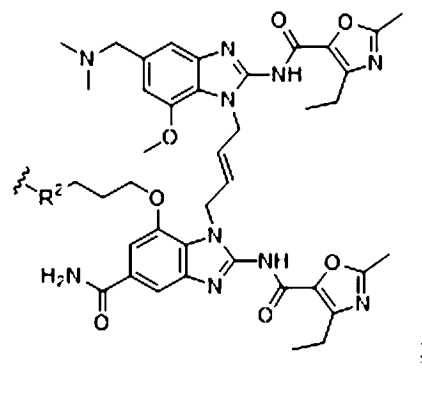
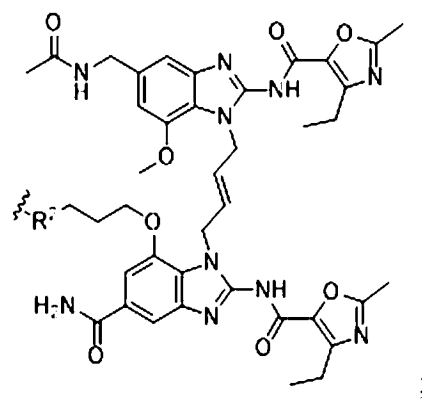
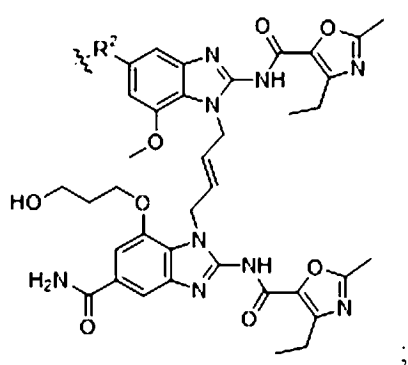
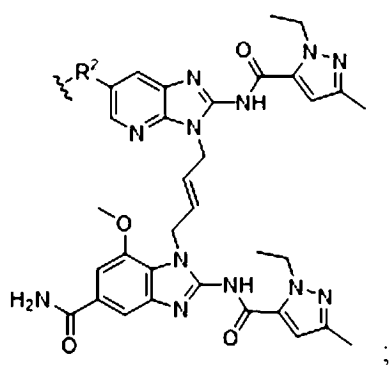
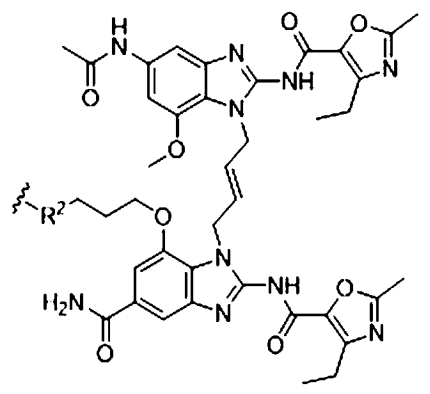
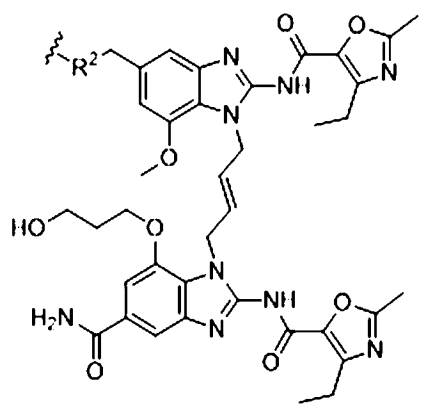


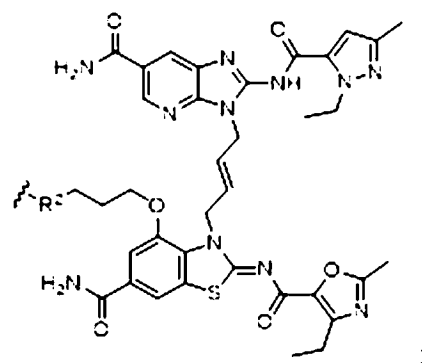
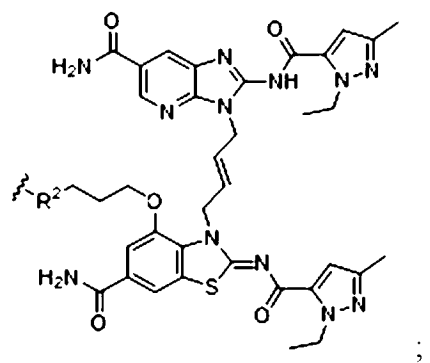
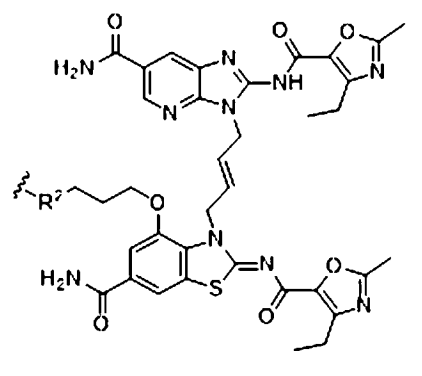
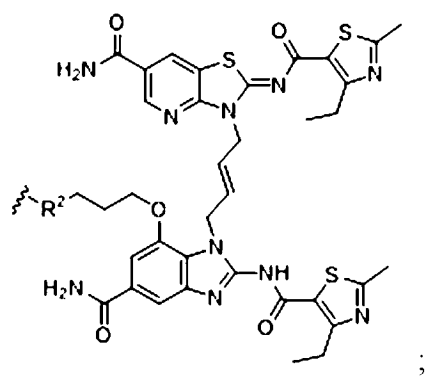
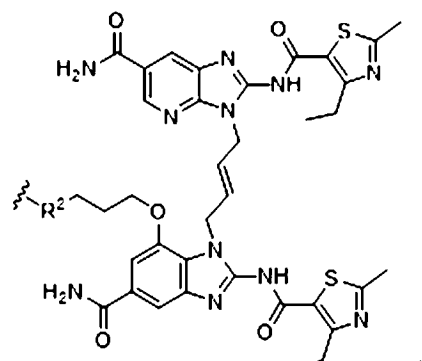
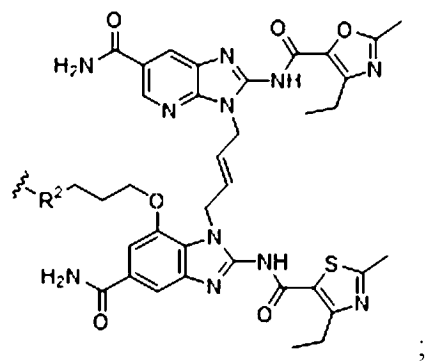
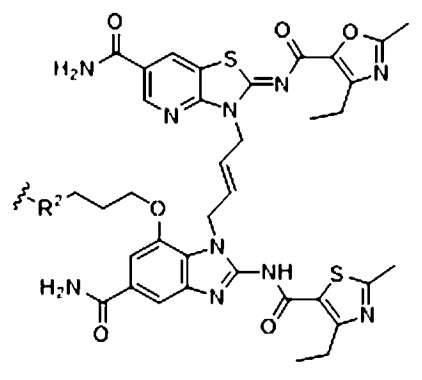
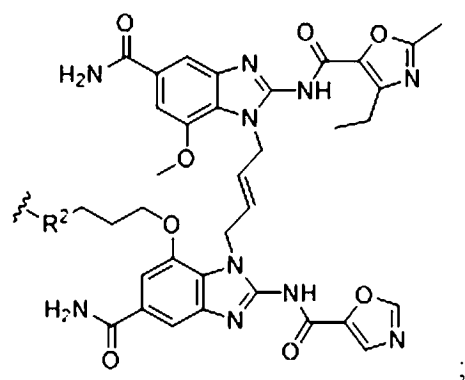




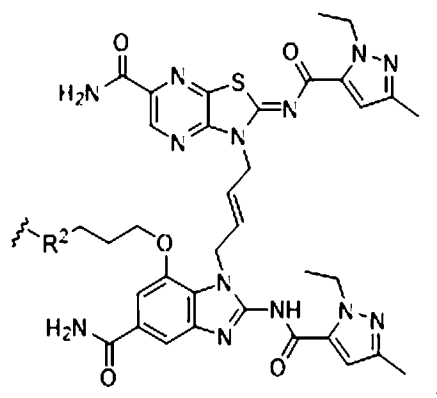
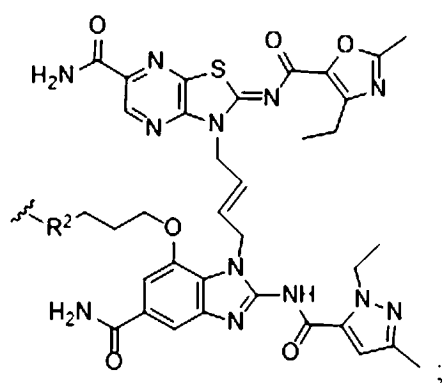
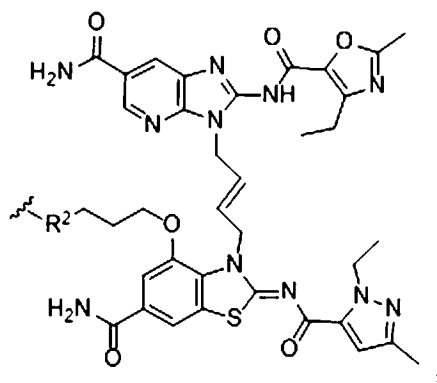
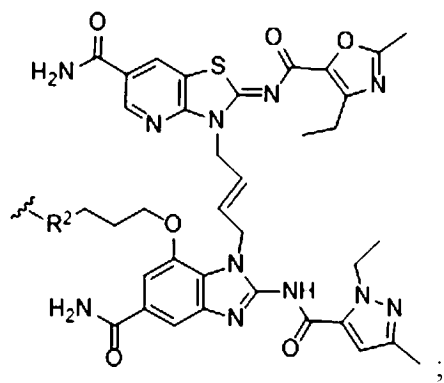
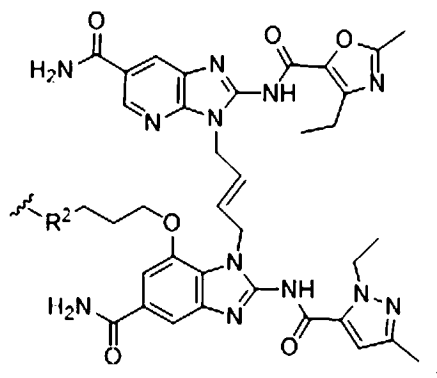
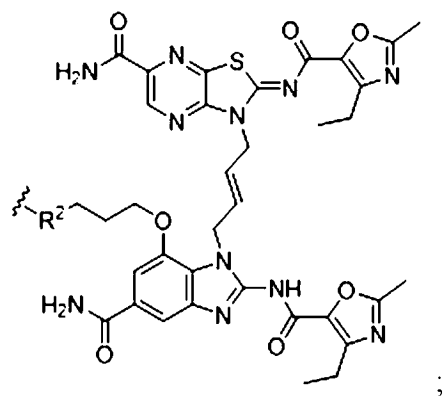
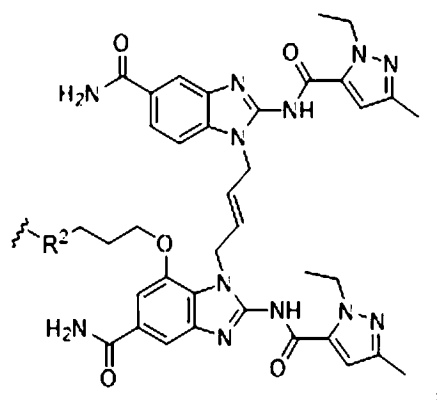
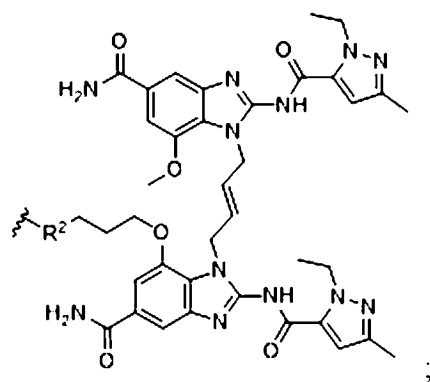


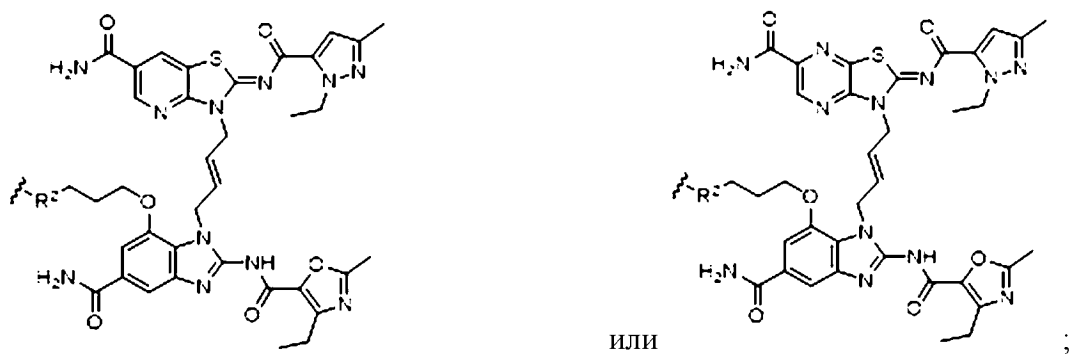








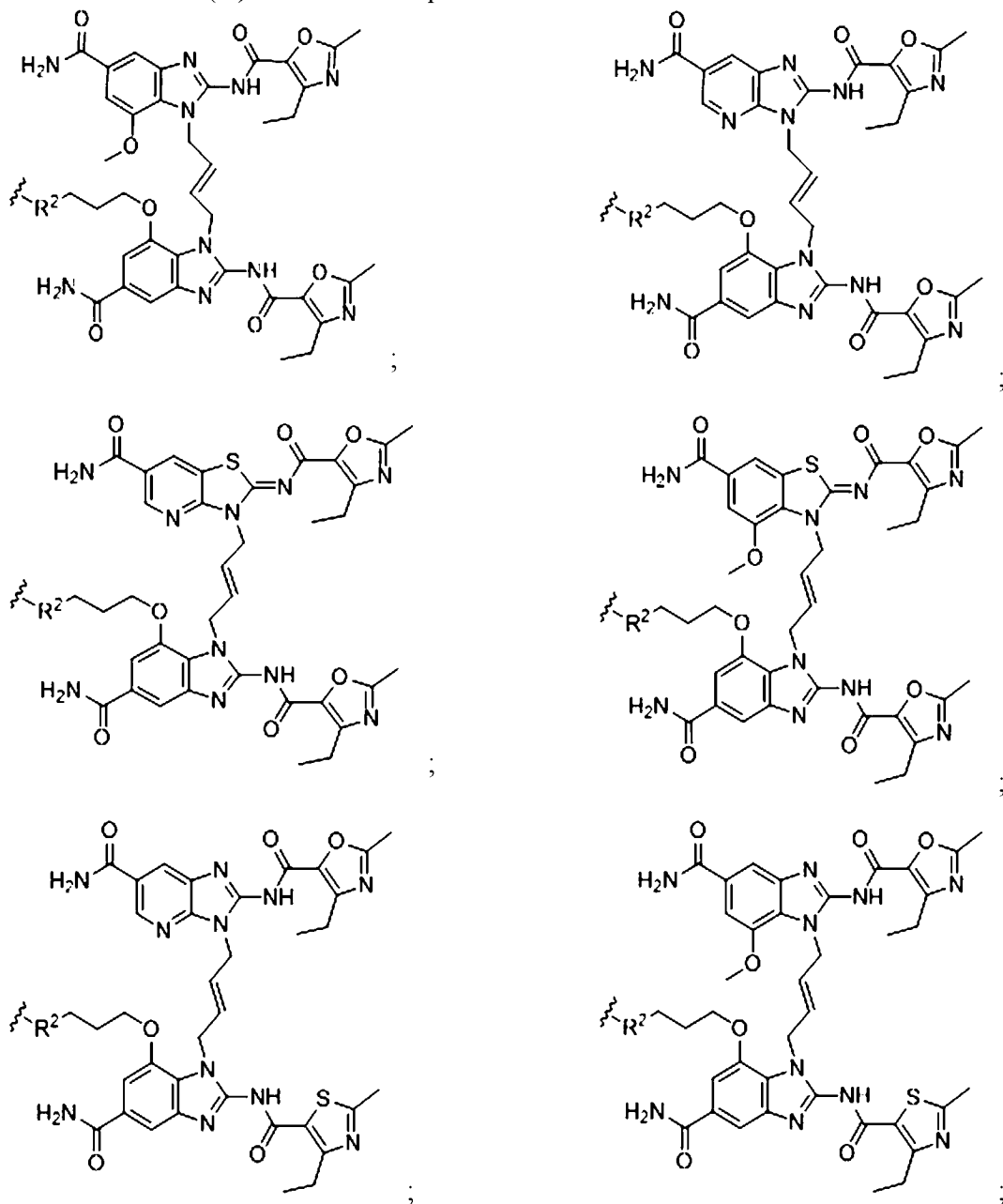


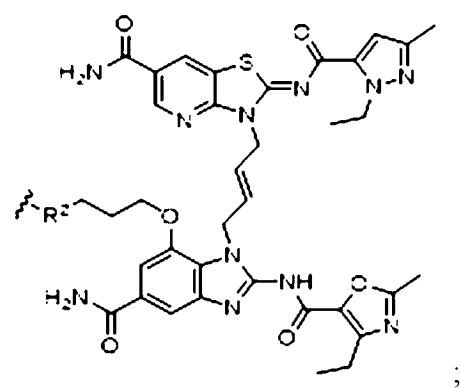
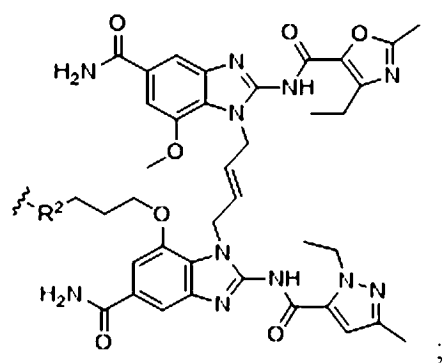
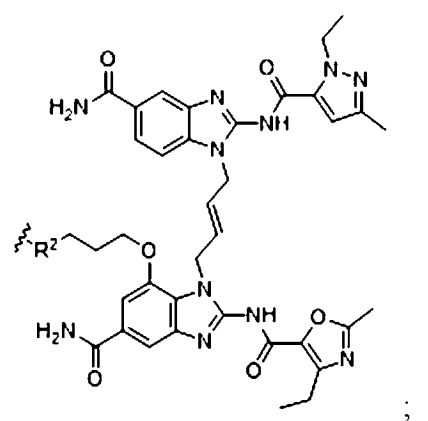
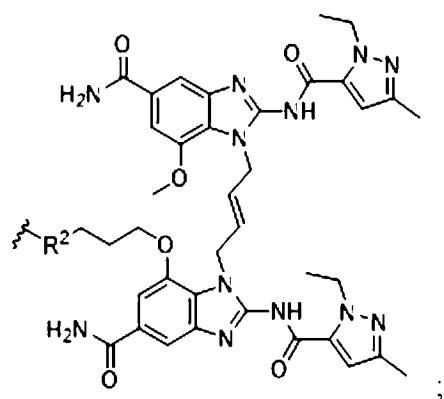
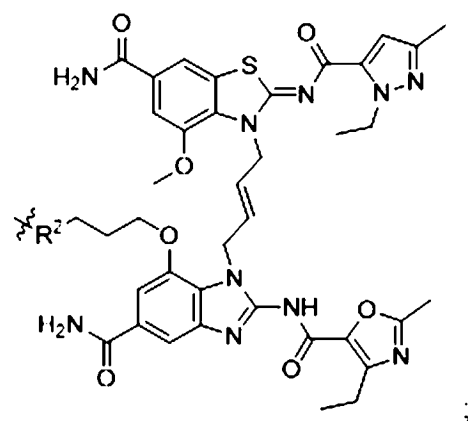
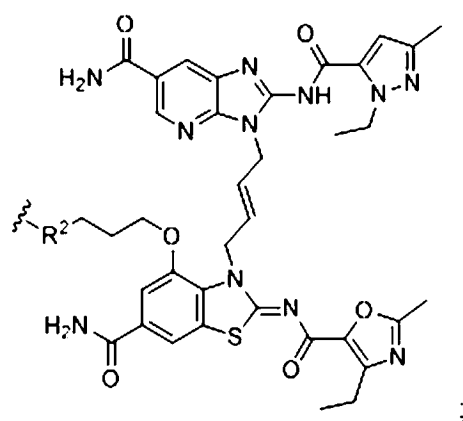
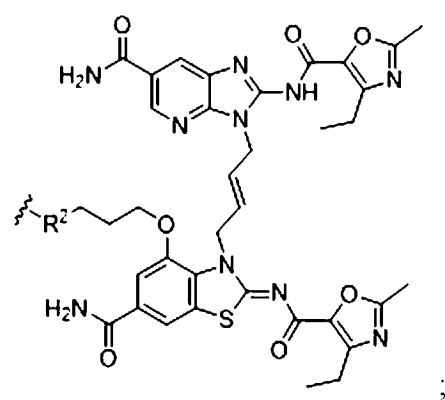
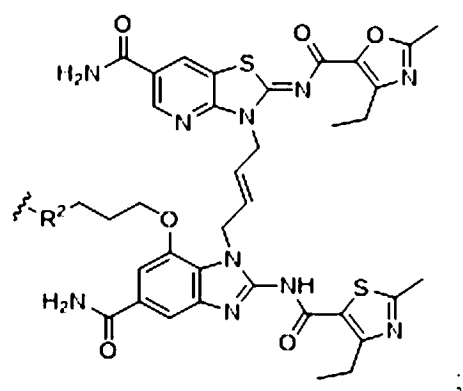


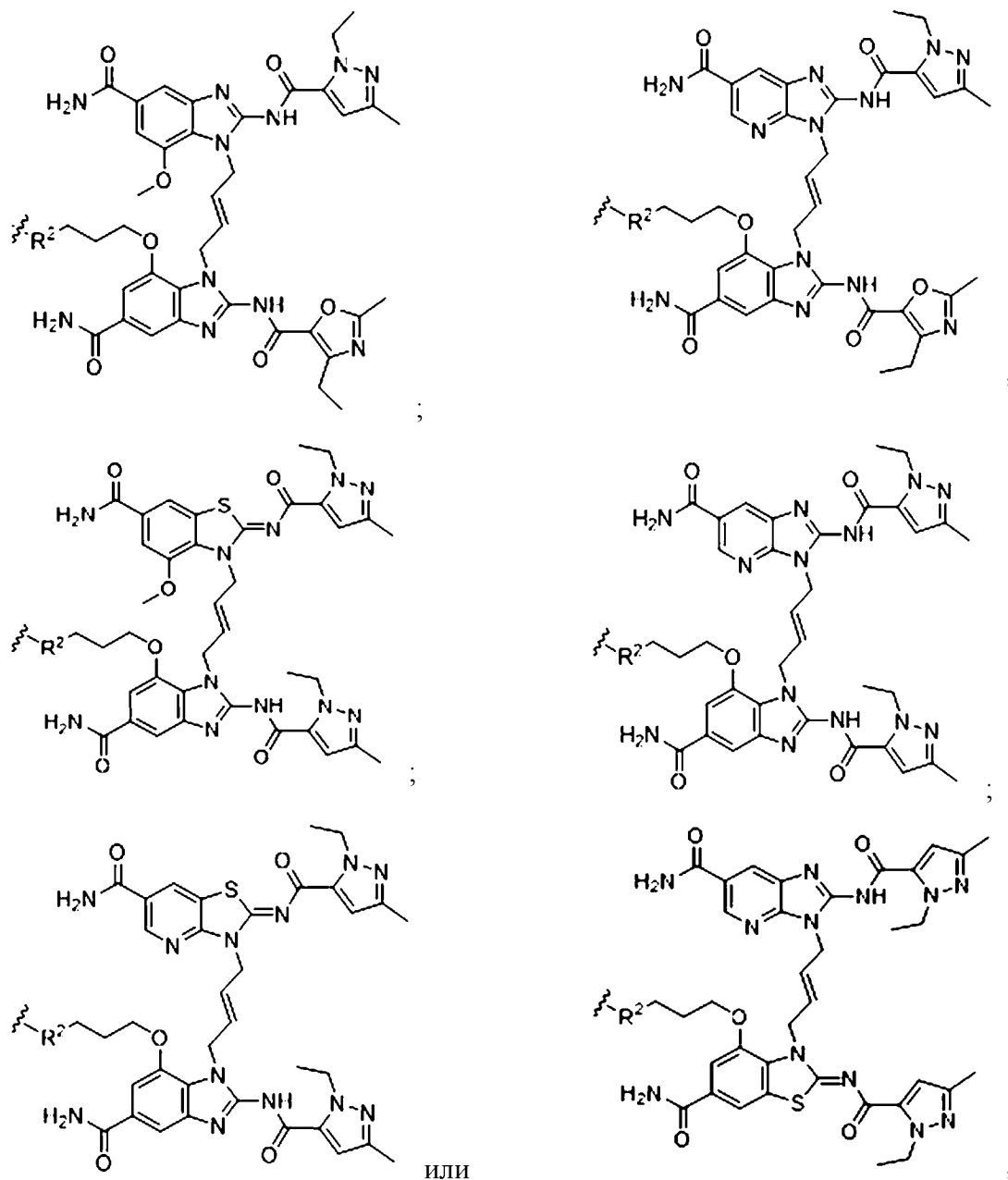
где:

$R^2$  отсутствует, представляет собой -O- или  $-NR^4$ ;  $R^4$  представляет собой H или  $C_{1-3}$  алкил; и  $\sim$  обозначает присоединение к  $L^D$ .

**[392]** В некоторых вариантах осуществления каждая часть лекарственного средства-агониста STING (D) независимо представляет собой:



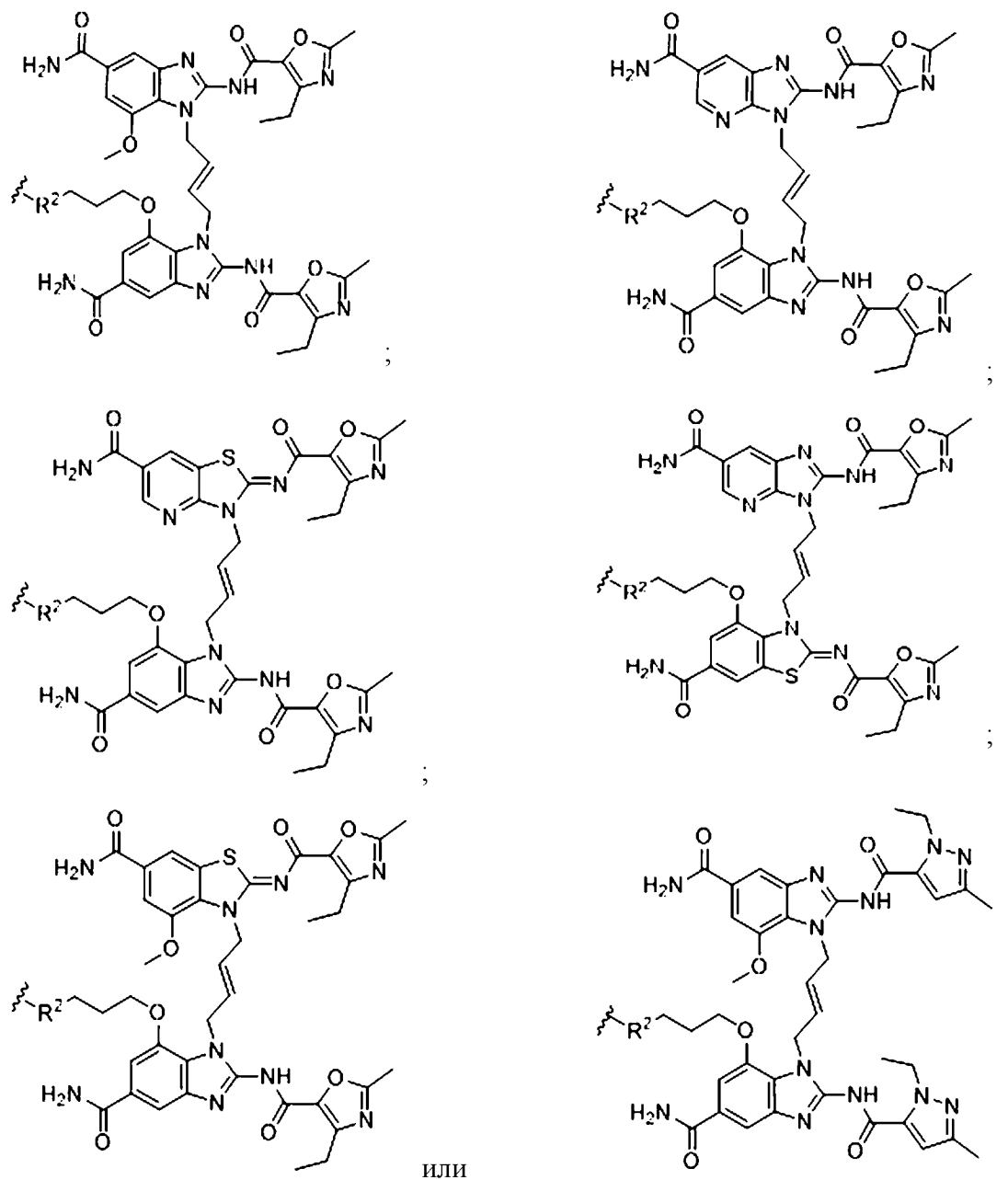




где:

$\text{R}^2$  отсутствует, представляет собой  $-\text{O}-$  или  $-\text{NR}^4-$ ;  $\text{R}^4$  представляет собой H или  $\text{C}_{1-3}$  алкил; и  $\text{---}$  обозначает присоединение к  $\text{L}^{\text{D}}$ .

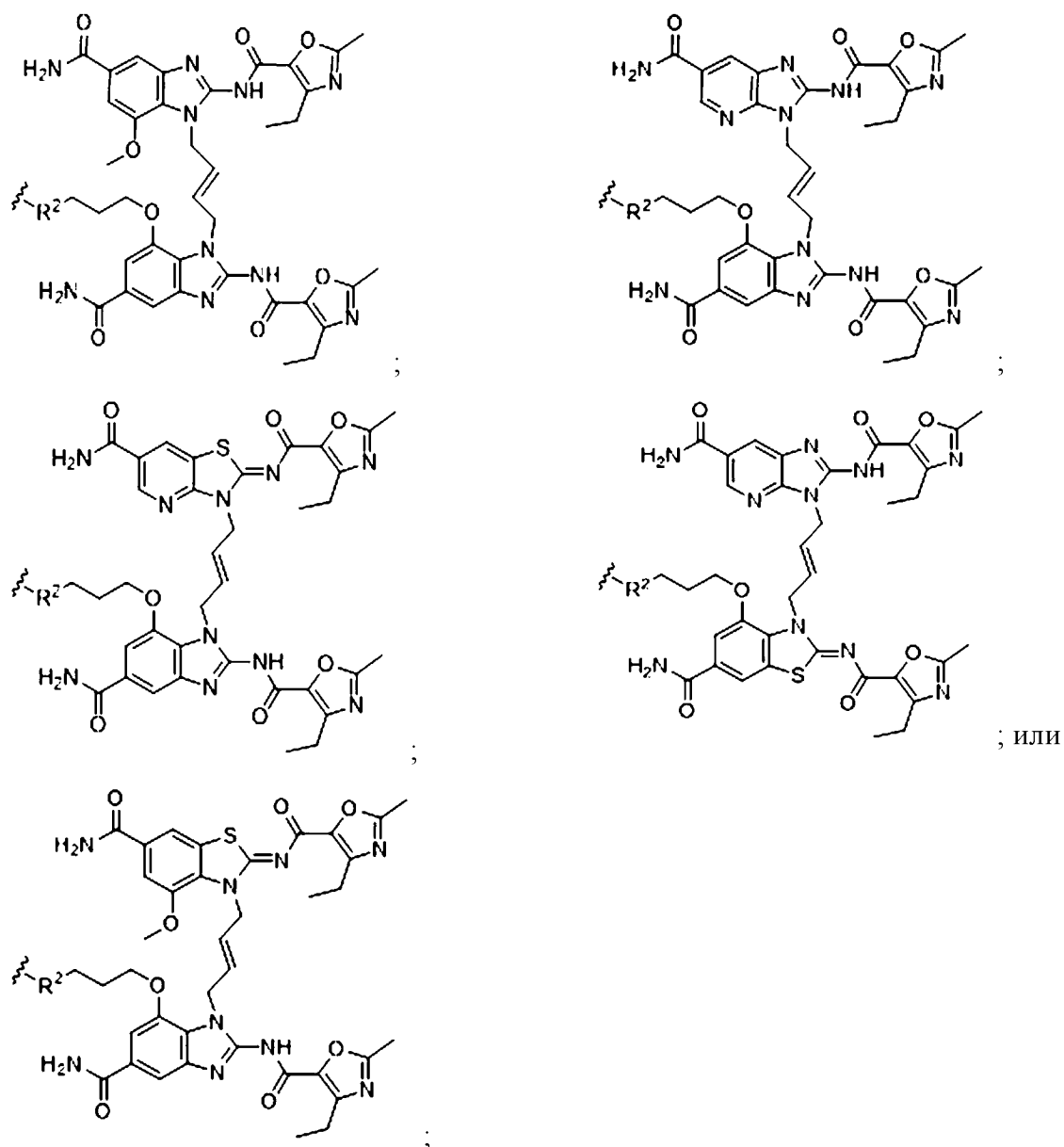
**[393]** В некоторых вариантах осуществления каждая часть лекарственного средства-агониста STING (D) независимо представляет собой:



где:

$R^2$  отсутствует, представляет собой -O- или  $-NR^4$ ;  $R^4$  представляет собой H или  $C_{1-3}$  алкил; и  $\sim$  обозначает присоединение к  $L^D$ .

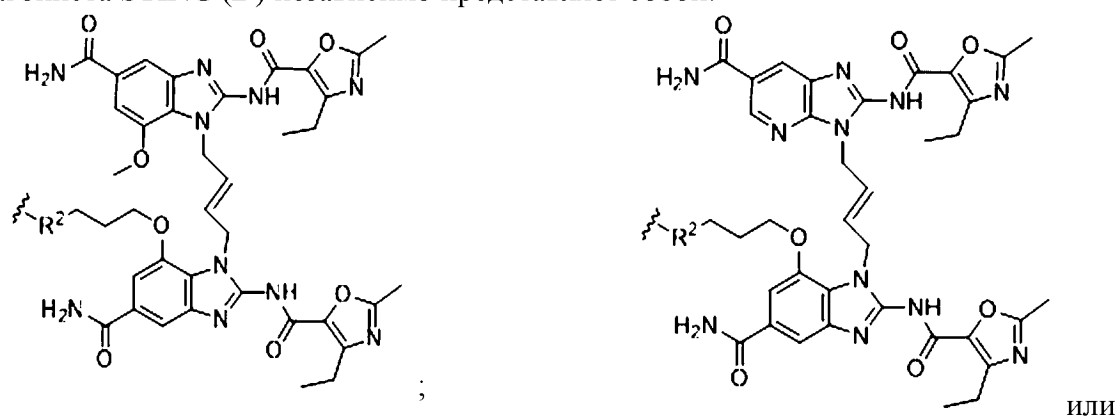
**[394]** В некоторых вариантах осуществления каждая часть лекарственного средства-агониста STING (D) независимо представляет собой:

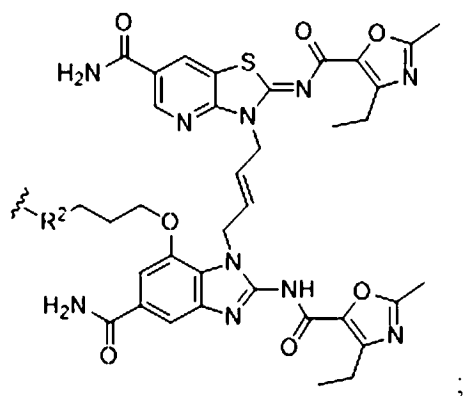


где:

$R^2$  отсутствует, представляет собой -O- или  $-NR^4$ ;  $R^4$  представляет собой H или  $C_{1-3}$  алкил; и  $\sim$  обозначает присоединение к  $L^D$ .

**[395]** В некоторых вариантах осуществления каждая часть лекарственного средства-агониста STING (D) независимо представляет собой:





где:

$R^2$  отсутствует, представляет собой -O- или  $-NR^4$ -;  $R^4$  представляет собой H или  $C_{1-3}$  алкил; и  $\text{---}\xi\text{---}$  обозначает присоединение к  $L^D$ .

### Гидрофильная группа (вариабельный $T^1$ )

[396] В некоторых вариантах осуществления гидрофильная группа, включенная в конъюгаты или каркасы по изобретению, представляет собой растворимый в воде и по существу не антигенный полимер. Примеры гидрофильной группы включают, но не ограничиваются ими, полиспирты, полиэферы, полианионы, поликатионы, полифосфорные кислоты, полиамины, полисахариды, полигидроксисоединения, полилизины и их производные. В некоторых вариантах осуществления один конец гидрофильной группы может быть функционализирован таким образом, чтобы он мог быть ковалентно присоединен к линкеру  $M^A$  (например, к аминокислоте в линкере  $M^A$ ) посредством нерасщепляемой связи или посредством расщепляемой связи. В некоторых вариантах осуществления функционализация может быть осуществлена, например, через амин, тиол, сложный эфир NHS, малеинимид, алкин, азид, карбонил или другую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления другой конец (или концы) гидрофильной группы является свободным или несвязанным. В некоторых вариантах осуществления под "несвязанным" подразумевают, что гидрофильная группа не соединена с другой группой, такой как D или лекарственный элемент, или другие компоненты конъюгатов или каркасов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления свободный и несвязанный конец гидрофильной группы может включать метокси, карбоновую кислоту, спирт или другую подходящую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления метокси, карбоновая кислота, спирт или другая подходящая функциональная группа выступает в качестве кэпа для конца или концов гидрофильной группы.

[397] В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связь относится к связи, которая по существу не является чувствительной к расщеплению в ходе циркуляции в плазме, но является чувствительной к расщеплению во внутриклеточной или внутриопухоловой среде. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемая связь представляет собой связь, которая по существу не является чувствительной к расщеплению в какой-либо биологической среде. В некоторых вариантах осуществления примерами

расщепляемых связей являются химический гидролиз гидразона, восстановление дисульфида и ферментативное расщепление пептидной связи или гликозидной связи. В некоторых вариантах осуществления иллюстративное присоединение гидрофильной группы осуществляется через амидные связи, простые эфирные связи, сложные эфирные связи, гидразоновые связи, оксимные связи, дисульфидные связи, пептидные связи или триазоловые связи. В некоторых вариантах осуществления присоединение гидрофильной группы к линкеру  $M^A$  (например, к аминокислоте в линкере  $M^A$ ) осуществляется через амидную связь.

**[398]** В некоторых вариантах осуществления, где конъюгат или каркас по изобретению содержит более одной гидрофильной группы, несколько гидрофильных групп могут представлять собой одинаковые или разные химические части (например, гидрофильные группы с разной молекулярной массой, количеством субъединиц или химической структурой). В некоторых вариантах осуществления несколько гидрофильных групп могут быть присоединены к линкеру  $M^A$  в одном участке присоединения или разных участках.

**[399]** В некоторых вариантах осуществления добавление гидрофильной группы может иметь два потенциальных действия на фармакокинетику полученного конъюгата. В некоторых вариантах осуществления желаемое действие представляет собой снижение клиренса (и последующее повышение экспозиции) в результате снижения неспецифических взаимодействий, индуцированных экспонированными гидрофобными элементами лекарственного средства или структуры лекарственное средство-линкер. В некоторых вариантах осуществления нежелательным действием является снижение объема и скорости распределения, которое может быть результатом увеличения молекулярной массы конъюгата. В некоторых вариантах осуществления увеличение молекулярной массы гидрофильной группы увеличивает гидродинамический радиус конъюгата, что приводит к снижению диффузионной способности, которое может уменьшить способность конъюгата к проникновению в опухоль. Вследствие этих двух конкурирующих фармакокинетических эффектов может быть желательным использование гидрофильной группы, которая является достаточно большой для уменьшения клиренса конъюгата, таким образом повышая экспозицию в плазме, но не настолько большой, чтобы значительно уменьшить его диффузионную способность, которая может снижать способность конъюгата достигать намеренной популяции клеток-мишеней.

**[400]** В некоторых вариантах осуществления гидрофильная группа включает, но не ограничивается ими, сахарный спирт (также известный как полиспирт, многоатомный спирт, альдит или глицит, такой как инозитол, глицерин, эритрит, треитол, арабит, ксилит, рибит, галактит, маннит, сорбит и т.п.) или его производное (например, аминополиспирт), углевод (например, сахарид), поливиниловый спирт, полимер на основе углевода (например, декстраны), гидроксипропилметакриламид (HPMA), полиалкиленоксид и/или их сополимер.

**[401]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  содержит множество гидроксильных



("-OH") групп, таких как части, которые содержат моносахариды, олигосахариды, полисахариды и т.п.

**[402]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  содержит множество групп  $-(CR_{58}OH)-$ , где  $R_{58}$  представляет собой -H или  $C_{1-8}$  алкил.

**[403]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой -OH или  $-\overset{\sim}{\text{NH}}-R_{60}-(CR_{58}OH)_{n1}-R_{61}$ , где:

$n_1$  представляет собой целое число от 0 до приблизительно 6;

каждый  $R_{58}$  независимо представляет собой -H или  $C_{1-8}$  алкил;

$R_{60}$  представляет собой связь,  $C_{1-6}$  алкильный линкер или  $-CHR_{59}-$ , где  $R_{59}$  представляет собой -H,  $C_{1-8}$  алкил, циклоалкил или арилалкил;

$R_{61}$  представляет собой  $CH_2OR_{62}$ ,  $COOR_{62}$ ,  $-(CH_2)_{n2}COOR_{62}$  или гетероциклоалкил, замещенный одним или несколькими гидроксилами;

$R_{62}$  представляет собой -H или  $C_{1-8}$  алкил; и

$n_2$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 5.

**[404]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой -OH.

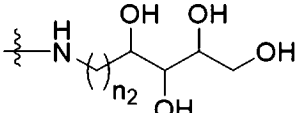
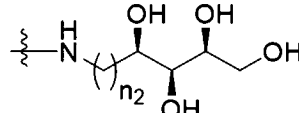
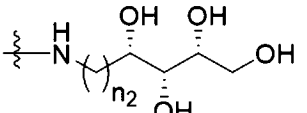
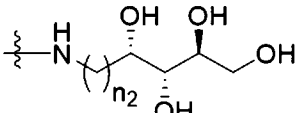
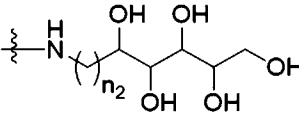
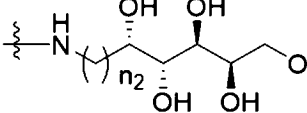
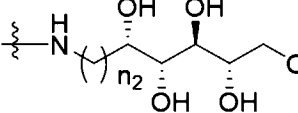
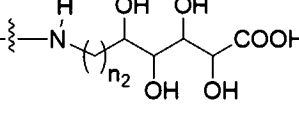
**[405]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $-\overset{\sim}{\text{NH}}-R_{60}-(CR_{58}OH)_{n1}-R_{61}$ .

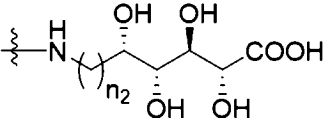
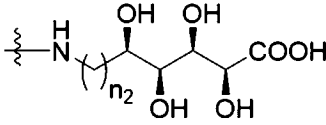
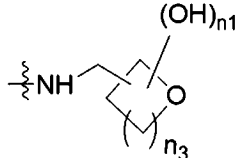
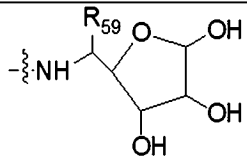
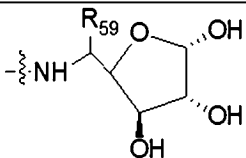
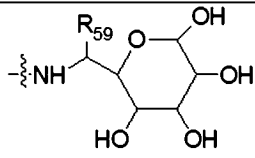
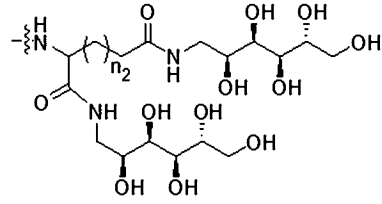
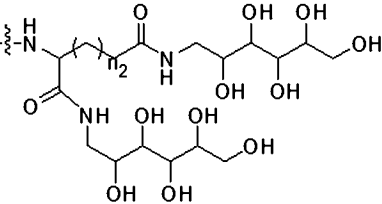
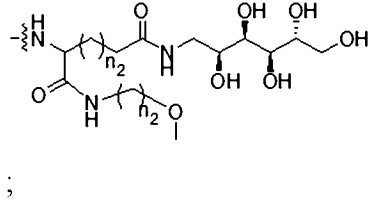
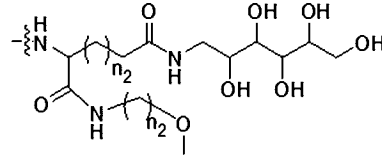
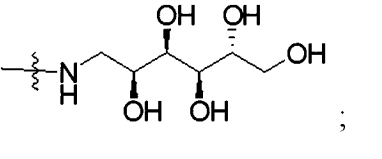
**[406]** В некоторых вариантах осуществления  $R_{58}$  представляет собой -H;  $R_{60}$  представляет собой связь или  $C_{1-6}$  алкиловый линкер;  $n_1$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 6; и  $R_{61}$  представляет собой  $CH_2OH$  или  $COOH$ .

**[407]** В некоторых вариантах осуществления  $R_{58}$  представляет собой -H;  $R_{60}$  представляет собой  $-CHR_{59}-$ ;  $n_1$  равен 0; и  $R_{61}$  представляет собой гетероциклоалкил, замещенный одним или несколькими гидроксилами, например, моносахарид.

**[408]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  содержит глюкозиламин, диамин или триамин.

**[409]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  содержит один или несколько из следующих фрагментов или их стереоизомеров:

|                                                                                           |                                                                                           |                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) $-\overset{\sim}{\text{NH}}-(CHOH)_{n1}-R_{59}$ ;                                     | (2)  ; | (3)  ; |
| (4)  ; | (5)  ; | (6)  ; |
| (7)  ; | (8)  ; | (9)  ; |

|                                                                                            |                                                                                                 |                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                            |                                                                                                 | ;                                                                                           |
| (10)<br>  | (11)<br>      | (12)<br> |
| (13)<br>  | (14)<br>       | (15)<br> |
| (16)<br>  | (17)<br>      | (18)<br> |
| (19)<br> | или (20)<br> |                                                                                             |

где:

$R_{59}$  представляет собой -H,  $C_{1-8}$  алкил, циклоалкил или ариалкил;

$n_1$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 6;

$n_2$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 5; и

$n_3$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 3.

**[410]** Понятно, что в рамках настоящего изобретения предусматриваются все стереохимические формы гидрофильных групп. Например, в приведенных выше формулах гидрофильная группа может происходить из рибозы, ксилозы, глюкозы, маннозы, галактозы или другого сахара и сохранять стереохимическое расположение выступающих гидроксильных и алкильных групп, присутствующих в этих молекулах.

**[411]** Следует понимать, что в вышеуказанных формулах также предусматриваются различные дезоксисоединения. В качестве иллюстрации, предусматривается один или несколько из приведенных ниже признаков для гидрофильных групп, когда это применимо.

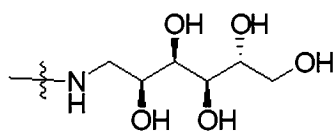
**[412]** В некоторых вариантах осуществления  $n_3$  равен 2 или 3.

**[413]** В некоторых вариантах осуществления  $n_1$  равен 1, 2 или 3.

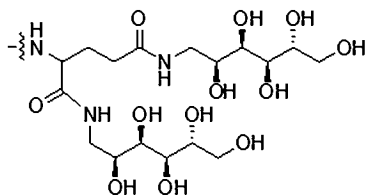
**[414]** В некоторых вариантах осуществления  $n_2$  равен 1.

**[415]** В некоторых вариантах осуществления  $R_{59}$  представляет собой водород.

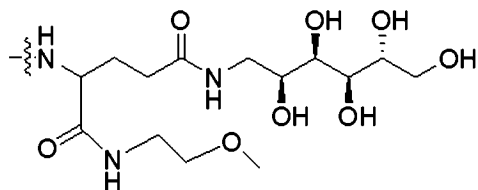
**[416]** В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой



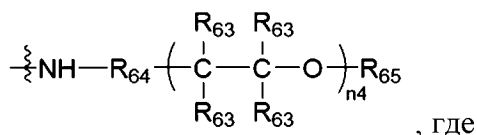
. В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой



[417] В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой



[418] В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой



$n_4$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 25;

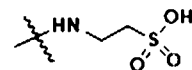
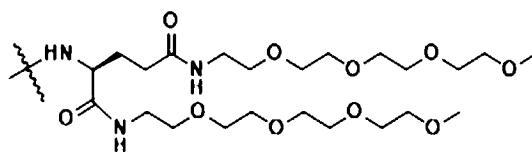
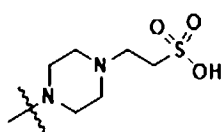
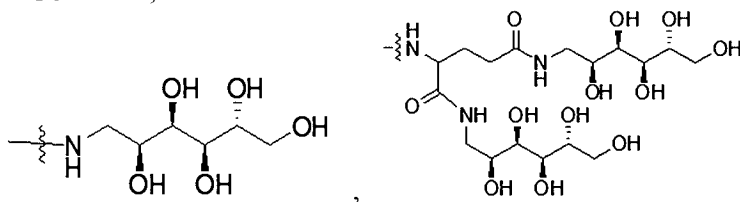
каждый  $R_{63}$  независимо представляет собой -H или  $C_{1-8}$  алкил;

$R_{64}$  представляет собой связь или  $C_{1-8}$  алкильный линкер;

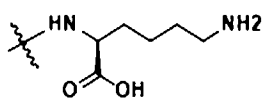
$R_{65}$  представляет собой -H,  $C_{1-8}$  алкил,  $-(CH_2)_{n2}COOR_{62}$  или  $-(CH_2)_{n2}COR_{66}$ ;

$R_{62}$  представляет собой H или  $C_{1-8}$  алкил;

$R_{66}$  представляет собой H,



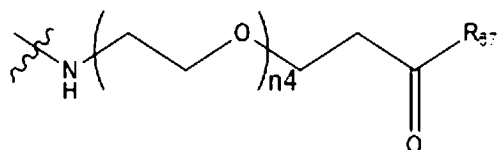
или



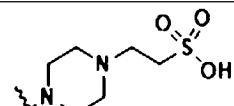
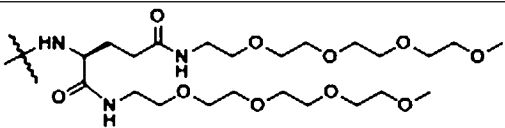
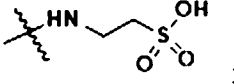
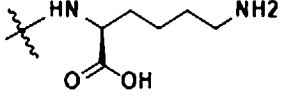
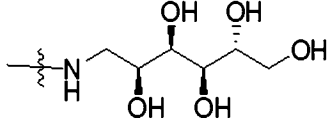
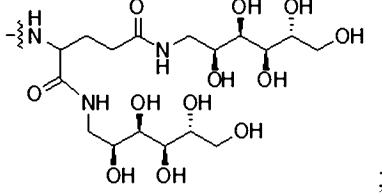
; и

$n_2$  представляет собой целое число от 1 до приблизительно 5.

[419] В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой:

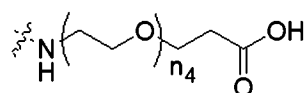


где R<sub>67</sub> представляет собой: (1) OH

|                                                                                                   |                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (2)  ;           | (3)  ;       |
| (4)  ;           | (5)  ;       |
| [420] (6)  ; или | [421] (7)  ; |

где n<sub>4</sub> представляет собой целое число от приблизительно 2 до приблизительно 20, от приблизительно 4 до приблизительно 16, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 12.

[422] В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой

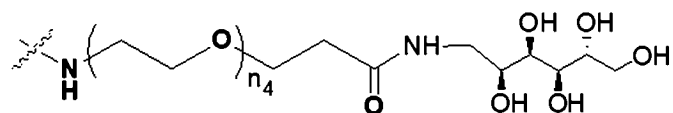


[423] В некоторых вариантах осуществления n<sub>4</sub> представляет собой целое число от приблизительно 2 до приблизительно 20, от приблизительно 4 до приблизительно 16, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 12.

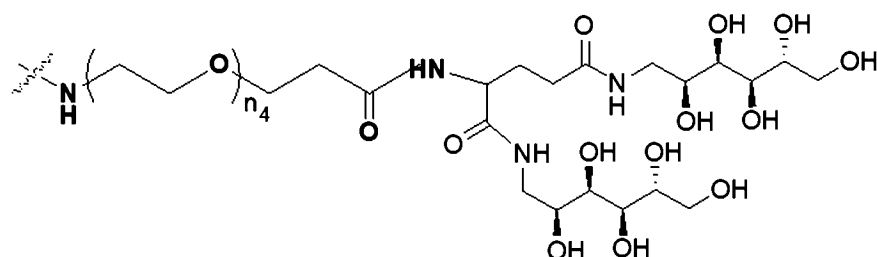
[424] В некоторых вариантах осуществления n<sub>4</sub> равен 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

[425] В некоторых вариантах осуществления n<sub>4</sub> равен 8 или 12.

[426] В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой



или



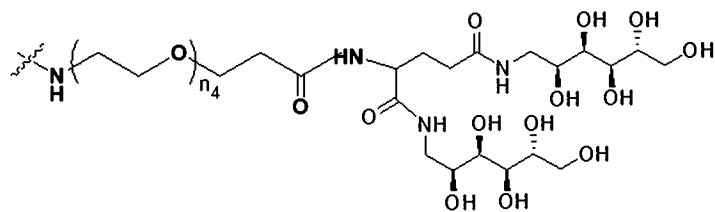
, где n<sub>4</sub> представляет собой

целое число от приблизительно 2 до приблизительно 24, от приблизительно 4 до приблизительно 16, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 12.

[427] В некоторых вариантах осуществления n<sub>4</sub> равен 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

[428] В некоторых вариантах осуществления n<sub>4</sub> равен 8. В некоторых вариантах осуществления n<sub>4</sub> равен 12.

[429] В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой



, где  $n_4$  равен 8.

[430] В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  включает полиэфир, например, полиалкиленгликоль (РАО). РАО включает, но не ограничивается ими, полимеры низших алкиленоксидов, в частности, полимеры этиленоксида, такие как, например, пропиленоксид, полипропиленгликоли, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры.

[431] В некоторых вариантах осуществления полиалкиленгликоль представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), включающий, но не ограничивающийся ими, полидисперсный ПЭГ, монодисперсный ПЭГ и дискретный ПЭГ. Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь в отношении размеров и молекулярных масс, в то время как монодисперсные ПЭГ, как правило, очищены из гетерогенных смесей и, таким образом, имеют одну длину цепи и молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления элементы ПЭГ представляют собой дискретные ПЭГ, которые имеют единичную молекулу с определенной и указанной длиной цепи. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоль представляет собой мПЭГ.

[432] В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  содержит элемент ПЭГ, который содержит одну или несколько цепей ПЭГ. Цепи ПЭГ могут быть связаны вместе, например, в линейной, разветвленной или звездообразной конфигурации. Элемент ПЭГ, в дополнение к наличию повторяющихся субэлементов ПЭГ, также может содержать материал не из ПЭГ (например, для облегчения соединения множества цепей ПЭГ друг с другом или для облегчения присоединения к аминокислоте). Материал не из ПЭГ относится к атомам в цепи ПЭГ, которые не являются частью повторяющихся субэлементов  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ . В некоторых вариантах осуществления цепь ПЭГ может содержать две мономерных цепи ПЭГ, соединенных друг с другом через элементы не из ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ может содержать две линейных цепи ПЭГ, присоединенных к центральной коровой части, которая присоединена к аминокислоте (т.е. элемент ПЭГ сам по себе является разветвленным).

[433] Элемент ПЭГ может быть ковалентно связан с линкером  $M^A$  (например, с аминокислотой в линкере  $M^A$ ) через реакционноспособную группу. Реакционноспособные группы представляют собой группы, с которыми может быть связана активированная молекула ПЭГ (например, свободная аминогруппа или карбоксильная группа). В некоторых вариантах осуществления N-концевые аминокислоты и остатки лизина (К) имеют свободную аминогруппу; и C-концевые аминокислотные остатки имеют свободную карбоксильную группу. Также в качестве реакционноспособной группы для присоединения ПЭГ можно использовать сульфгидрильные группы (например, присутствующие на

остатках цистеина).

**[434]** В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ может быть связан с линкером  $M^A$  (например, с аминокислотой в линкере  $M^A$ ) с использованием метоксилированного ПЭГ ("мПЭГ"), имеющего разные реакционноспособные части, включая, но не ограничиваясь ими, сукцинимидилсукцинат (SS), сукцинимидилкарбонат (SC), мПЭГ-имидат, паранитрофенилкарбонат (NPC), сукцинимидилпропионат (SPA) и циануровый хлорид. Примеры мПЭГ включают, но не ограничиваются ими, мПЭГ-сукцинимидилсукцинат (mPEG-SS), мПЭГ<sub>2</sub>-сукцинимидилсукцинат (mPEG<sub>2</sub>-SS), мПЭГ-сукцинимидил карбонат (mPEG-SC), мПЭГ<sub>2</sub>-сукцинимидилкарбонат (mPEG<sub>2</sub>-SC), мПЭГ-имидат, мПЭГ-пара-нитрофенилкарбонат (mPEG-NPC), мПЭГ-имидат, мПЭГ<sub>2</sub>-паранитрофенилкарбонат (mPEG<sub>2</sub>-NPC), мПЭГ-сукцинимидилпропионат (mPEG-SPA), мПЭГ<sub>2</sub>-сукцинимидилпропионат (mPEG<sub>2</sub>-SPA), мПЭГ-N-гидроксисукцинимид (mPEG-NHS), мПЭГ<sub>2</sub>-N-гидроксисукцинимид (mPEG<sub>2</sub>-NHS), мПЭГ-циануровый хлорид, мПЭГ<sub>2</sub>-циануровый хлорид, мПЭГ<sub>2</sub>-лизиол-NPC и мПЭГ<sub>2</sub>-Lys-NHS. Можно использовать широкое множество типов ПЭГ и можно использовать по существу любой подходящий реакционноспособный реагент ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный реагент ПЭГ приводит к образованию карбаматной или амидной связи при присоединении к многофункциональному линкеру или линкеру  $M^A$  (например, к аминокислоте в линкере  $M^A$ ). Реакционноспособные реагенты ПЭГ включают, но не ограничиваются ими, мПЭГ<sub>2</sub>-N-гидроксисукцинимид (mPEG<sub>2</sub>-NHS), бисфункциональный ПЭГ пропиональдегид (mPEG<sub>2</sub>-ALD), ПЭГ с множеством плеч, малеинимид-содержащий ПЭГ (mPEG(MAL)<sub>2</sub>, mPEG<sub>2</sub>(MAL)), мПЭГ-NH<sub>2</sub>, мПЭГ-сукцинимидилпропионат (mPEG-SPA), сукцинимид мПЭГ бутановую кислоту (mPEG-SBA), мПЭГ-сложные тиоэфиры, мПЭГ-двойные эфиры, мПЭГ-BTC, мПЭГ-бутиральдегид, мПЭГ-ацетальдегид диэтилацеталь (mPEG-ACET), гетерофункциональные ПЭГ (например, NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-винилсульфон(NHS-PEG-VS) или NHS-PEG-MAL), ПЭГ-акрилаты (ACRL-PEG-NHS), PEG-фосфолипиды (например, mPEG-DSPE), ПЭГ с множеством плеч серии SUNBRITE™, включая ПЭГ на основе глицерина, активированные посредством химии, выбранной специалистами в данной области, любые активированные ПЭГ SUNBRITE (включая, но не ограничиваясь ими карбоксил-ПЭГ, п-НФ-ПЭГ, тресил-ПЭГ, альдегид-ПЭГ, ацеталь-ПЭГ, аминокс-ПЭГ, тиол-ПЭГ, малеимидо-ПЭГ, гидроксил-ПЭГ-амин, аминокс-ПЭГ-COOK гидроксил-ПЭГ-альдегид, ПЭГ типа карбонового ангидрида, функционализированный ПЭГ-фосфолипид и другие сходные и/или подходящие реакционноспособные ПЭГ.

**[435]** В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 6 субэлементов, по меньшей мере 7 субэлементов, по меньшей мере 8 субэлементов, по меньшей мере 9 субэлементов, по меньшей мере 10 субэлементов, по меньшей мере 11 субэлементов, по меньшей мере 12 субэлементов, по меньшей мере 13 субэлементов, по меньшей мере 14 субэлементов, по меньшей мере 15 субэлементов, по меньшей мере 16 субэлементов, по меньшей мере 17 субэлементов, по меньшей мере 18 субэлементов, по

меньшей мере 19 субэлементов, по меньшей мере 20 субэлементов, по меньшей мере 21 субэлемент, по меньшей мере 22 субэлемента, по меньшей мере 23 субэлемента или по меньшей мере 24 субэлемента. В некоторых таких вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит не более чем приблизительно 72 элемента.

**[436]** В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 6 субэлементов, по меньшей мере 7 субэлементов, по меньшей мере 8 субэлементов, по меньшей мере 9 субэлементов, по меньшей мере 10 субэлементов, по меньшей мере 11 субэлементов, по меньшей мере 12 субэлементов, по меньшей мере 13 субэлементов, по меньшей мере 14 субэлементов, по меньшей мере 15 субэлементов, по меньшей мере 16 субэлементов, по меньшей мере 17 субэлементов, по меньшей мере 18 субэлементов, по меньшей мере 19 субэлементов или по меньшей мере 20 субэлементов.

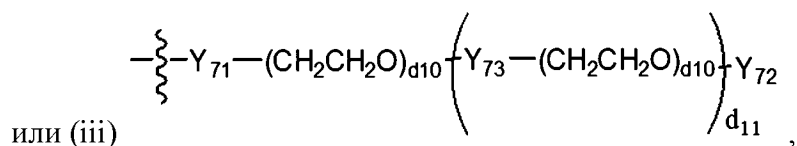
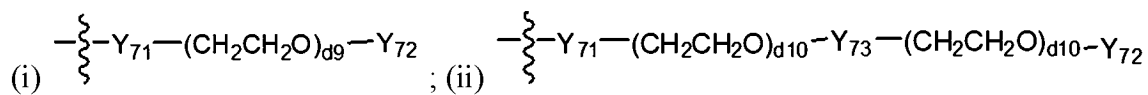
**[437]** В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 6 субэлементов, по меньшей мере 7 субэлементов, по меньшей мере 8 субэлементов, по меньшей мере 9 субэлементов, по меньшей мере 10 субэлементов, по меньшей мере 11 субэлементов, по меньшей мере 12 субэлементов, по меньшей мере 13 субэлементов, по меньшей мере 14 субэлементов, по меньшей мере 15 субэлементов, по меньшей мере 16 субэлементов, по меньшей мере 17 субэлементов или по меньшей мере 18 субэлементов.

**[438]** В некоторых вариантах осуществления элемент PEG содержит по меньшей мере 6 субэлементов, по меньшей мере 7 субэлементов, по меньшей мере 8 субэлементов, по меньшей мере 9 субэлементов, по меньшей мере 10 субэлементов, по меньшей мере 11 субэлементов или по меньшей мере 12 субэлементов.

**[439]** В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 8 субэлементов, по меньшей мере 9 субэлементов, по меньшей мере 10 субэлементов, по меньшей мере 11 субэлементов или по меньшей мере 12 субэлементов.

**[440]** В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ содержит по меньшей мере 6 субэлементов, по меньшей мере 7 субэлементов или по меньшей мере 8 субэлементов.

**[441]** В некоторых вариантах осуществления линейный элемент ПЭГ представляет собой:



где:



указывает на участок присоединения к линкеру  $M^A$  (например, к аминокислоте в линкере  $M^A$ );

$Y_{71}$  представляет собой элемент присоединения ПЭГ;

$Y_{72}$  представляет собой элемент экранирования ПЭГ;

$Y_{73}$  представляет собой элемент соединения ПЭГ (т.е. для соединения множества цепей субэлементов ПЭГ вместе);

$d_9$  представляет собой целое число от 2 до 72;

каждый  $d_{10}$  независимо представляет собой целое число от 1 до 72; и

$d_{11}$  представляет собой целое число от 2 до 5.

**[442]** В некоторых вариантах осуществления  $d_9$  представляет собой целое число от 2 до 24. В некоторых вариантах осуществления  $d_9$  представляет собой целое число от 4 до 24. В некоторых вариантах осуществления  $d_9$  представляет собой целое число от 6 до 24, от 8 до 24, от 10 до 24 или от 12 до 24.

**[443]** В некоторых вариантах осуществления в элементе ПЭГ присутствует по меньшей мере 6 субэлементов ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления в элементе ПЭГ присутствует по меньшей мере 8 субэлементов ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления в элементе ПЭГ присутствует по меньшей мере 10 субэлементов ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления в элементе ПЭГ присутствует по меньшей мере 12 субэлементов ПЭГ.

**[444]** В некоторых вариантах осуществления  $d_9$  равен 8 или приблизительно 8, 12 или приблизительно 12, 24 или приблизительно 24.

**[445]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $Y_{72}$  независимо представляет собой  $-C_{1-10}$  алкил,  $-C_{2-10}$  алкил- $CO_2H$ ,  $-C_{2-10}$  алкил-ОН,  $-C_{2-10}$  алкил- $NH_2$ ,  $-C_{2-10}$  алкил- $NH(C_{1-3}$  алкил) или  $C_{2-10}$  алкил- $N(C_{1-3}$  алкил) $_2$ .

**[446]** В некоторых вариантах осуществления  $Y_{72}$  представляет собой  $-C_{1-10}$  алкил,  $-C_{2-10}$  алкил- $CO_2H$ ,  $-C_{2-10}$  алкил-ОН или  $-C_{2-10}$  алкил- $NH_2$ .

**[447]** В некоторых вариантах осуществления элемент соединения ПЭГ является частью элемента ПЭГ и представляет собой материал не из ПЭГ, который служит для соединения двух или более цепей повторяющихся субэлементов  $CH_2CH_2O$ -. В некоторых вариантах осуществления элемент соединения ПЭГ  $Y_{73}$  представляет собой  $-C_{2-10}$  алкил- $C(O)-NH$ -,  $-C_{2-10}$  алкил- $NH-C(O)$ -,  $-C_{2-10}$  алкил- $NH$ -,  $-C_{2-10}$  алкил- $C(O)$ -,  $-C_{2-10}$  алкил-О- или  $-C_{2-10}$  алкил-S-.

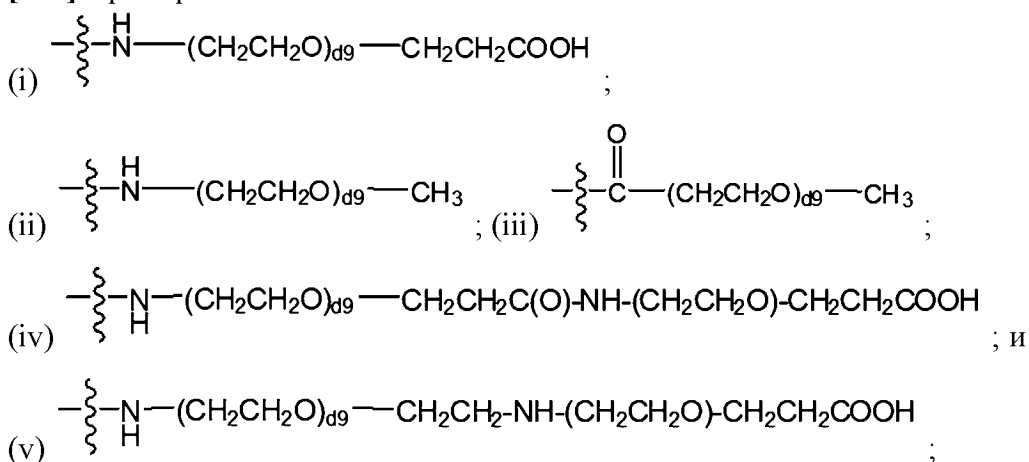
**[448]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $Y_{73}$  независимо представляет собой  $-C_{1-10}$  алкил- $C(O)-NH$ -,  $-C_{1-10}$  алкил- $NH-C(O)$ -,  $-C_{2-10}$  алкил- $NH$ -,  $-C_{2-10}$  алкил-О-,  $-C_{1-10}$  алкил-S- или  $-C_{1-10}$  алкил- $NH$ -.

**[449]** В некоторых вариантах осуществления элемент присоединения ПЭГ является частью элемента ПЭГ и служит для присоединения элемента ПЭГ к линкеру  $M^A$  (например, к аминокислоте в линкере  $M^A$ ). В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет функциональную группу, которая образует связь с элементом ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы для присоединения элемента ПЭГ к аминокислоте включают сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей или простых тиоэфирных связей, группы альдегидов, кетонов или гидразинов для образования гидразоновых связей, гидросиламин для образования оксимных связей, карбоновые или



аминогруппы для образования пептидных связей, карбоновые или гидроксигруппы для образования сложноэфирных связей, сульфоновые кислоты для образования сульфонамидных связей, спирты для образования карбаматных связей и амины для образования сульфонамидных связей, или карбаматных связей, или амидных связей. В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ может быть присоединен к аминокислоте, например, через дисульфидную, простую тиоэфирную, гидразоновую, оксимную, пептидную, сложную эфирную, сульфонамидную, карбаматную или амидную связь. В некоторых вариантах осуществления реакция для присоединения элемента ПЭГ может представлять собой реакцию циклоприсоединения, присоединения, присоединения/элиминирования или замещения, или их комбинацию, когда это применимо.

[450] Примеры линейных элементов ПЭГ включают:



где  $\begin{array}{c} \text{---} \\ | \\ \text{---} \end{array}$  указывает на участок присоединения к многофункциональному линкеру или линкеру  $M^A$  (например, к аминокислоте в линкере  $M^A$ ), и каждый  $d9$  независимо представляет собой целое число от 4 до 24, от 6 до 24, от 8 до 24, от 10 до 24, от 12 до 24, от 14 до 24 или от 16 до 24.

[451] В некоторых вариантах осуществления  $d9$  составляет приблизительно 8, приблизительно 12 или приблизительно 24.

[452] В некоторых вариантах осуществления  $d9$  составляет приблизительно 8.

[453] В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ имеет размер от приблизительно 300 Да до приблизительно 5 кДа; от приблизительно 300 Да до приблизительно 4 кДа; от приблизительно 300 Да до приблизительно 3 кДа; от приблизительно 300 Да до приблизительно 2 кДа; или от приблизительно 300 Да до приблизительно 1 кДа. В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ имеет по меньшей мере 6 субэлементов или по меньшей мере 8, 10 или 12 субэлементов. В некоторых вариантах осуществления элемент ПЭГ имеет по меньшей мере 6 субэлементов или по меньшей мере 8, 10 или 12 субэлементов, но не более 24 субэлементов.

[454] В некоторых вариантах осуществления подходящие полиэтиленгликоли могут

иметь свободную гидроксигруппу на каждом конце молекулы полимера, или могут иметь одну гидроксигруппу, преобразованную в простой эфир посредством группы низшего алкила, например, метильной группы. В некоторых вариантах осуществления подходящие полиэтиленгликоли являются производными полиэтиленгликолей, имеющими поддающиеся этерификации карбоксигруппы. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоли являются коммерчески доступными под торговым наименованием ПЭГ, обычно в качестве смесей полимеров, характеризующихся средней молекулярной массой. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоли имеют среднюю молекулярную массу от приблизительно 300 до приблизительно 5000. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоли имеют среднюю молекулярную массу от приблизительно 600 до приблизительно 1000.

**[455]** В некоторых вариантах осуществления примеры гидрофильных групп, которые являются пригодными для конъюгатов, каркасов и способов, описанных в настоящем описании, могут быть найдены, например, в US 8367065, колонка 13; US 8524696, колонка 6; WO2015/057699 и WO 2014/062697, содержание каждой из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### **Антитела**

**[456]** В некоторых вариантах осуществления гликопротеин, содержащий заместитель корового N-ацетилглюкозамина (часть корового GlcNAc), представляет собой антитело, содержащее заместитель корового N-ацетилглюкозамина (часть корового GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления гликопротеин представляет собой моноклональные антитело (mAb) IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG-антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG1-антитело. В некоторых вариантах осуществления, когда указанное антитело представляет собой целое антитело, антитело содержит одну или несколько (например, одну) частей корового GlcNAc на каждой тяжелой цепи, причем указанная часть корового GlcNAc необязательно является фукозилированной. В некоторых вариантах осуществления целое антитело содержит две или более (например, две) необязательно фукозилированных частей корового GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления, когда указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело или фрагмент антитела, например, Fab- или Fc-фрагмент, антитело содержит одну или несколько частей корового GlcNAc, которые необязательно являются фукозилированными. В некоторых вариантах осуществления в антителе, содержащем часть корового GlcNAc, указанная часть корового GlcNAc может находиться в любом месте антитела при условии, что заместитель не закрывает участок связывания антигена на антителе. В некоторых вариантах осуществления указанная часть корового GlcNAc присутствует в нативном участке N-гликозилирования антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит или сконструировано так, чтобы оно содержало, по меньшей мере одну химически реакционноспособную группу или химически реакционноспособную аминокислотную часть или боковые цепи.

[457] В некоторых вариантах осуществления антитело способно направлять конъюгат в конкретные ткани, клетки или части клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело способно направлять конъюгат в культуру или в целом организме, или в обоих из них. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит лиганд, который находится на поверхности клетки(ок)-мишени, с которой он связывается, с эффективной специфичностью, аффинностью и авидностью. В некоторых вариантах осуществления антитело направляет конъюгат в ткани, отличные от печени. В некоторых вариантах осуществления антитело направляет конъюгат в конкретную ткань, такую как печень, почка, легкое или поджелудочная железа. В некоторых вариантах осуществления антитело направляет конъюгат в клетку-мишень (например, злокачественную клетку), к рецептору, экспрессируемому на клетке (например, злокачественной клетке), в ткань матрикса или на белок, ассоциированный со злокачественной опухолью (например, опухолевый антиген). В некоторых вариантах осуществления можно осуществлять нацеливание на клетки, образующие опухолевые сосуды. В некоторых вариантах осуществления антитело способно нацеливать конъюгат на конкретные типы клеток, например, специфически нацеливать на гепатоциты в печени в противоположность купферовским клеткам. В некоторых вариантах осуществления антитело способно направлять конъюгат к клеткам ретикулярной эндотелиальной или лимфатической системы, или к профессиональным фагоцитарным клеткам, таким как макрофаги или эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления конъюгат сам по себе является эффективной системой доставки без необходимости в специфическом нацеливании.

[458] В некоторых вариантах осуществления антитело способно направлять конъюгат в часть клетки (например, ядро, цитоплазма или эндосома). В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает связывание клеток с рецепторами или цитоплазматический транспорт в ядро, и входение в ядро и высвобождение из эндосом или других внутриклеточных везикул.

[459] В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит антитело против В7-Н4 или модифицированное антитело В7-Н4 по настоящему изобретению.

#### **Антитела В7-Н4**

[460] Изобретение относится к выделенным антителам, которые связываются с В7-Н4, трансмембранным белком типа I, находящимся, например, на поверхности антигенпредставляющих клеток (APC). Антитела против В7-Н4 включают, но не ограничиваются ими, гуманизированные антитела, химерные антитела, антитела мыши, антитела человека и антитела, содержащие CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи, описанные в настоящем описании.

[461] В некоторых вариантах осуществления антитела против В7-Н4 по изобретению специфически связываются с эпитопом на полноразмерном белке В7-Н4 человека, содержащим аминокислотную последовательность: MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRLKNVQLTD

AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA  
SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT  
ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK (SEQ ID NO: 59).

**[462]** В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 представляет собой антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 модулирует активность B7-H4. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, которое индуцирует ответ ADCC у индивидуума, которому вводят антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 не ингибирует активность B7-H4 в отношении подавления Т-клеток. Антитела против B7-H4 по настоящему изобретению могут представлять собой, например, полноразмерные антитела. Альтернативно антитела могут представлять собой фрагменты антител, такие как Fab-, Fab'- или Fab'2-фрагменты или одноцепочечные антитела (например, scFv). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG1-антитело.

**[463]** В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи и по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи, и по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи и по меньшей мере часть константной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 содержит две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи и по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи, и две легких цепи, где каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи и по меньшей мере часть константной области легкой цепи.

**[464]** В некоторых вариантах осуществления антитело человека против B7-H4 содержит одну или несколько константных областей человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи относится к изотипу, выбранному из IgA, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и IgD. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи человека относится к изотипу, выбранному из каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ). В некоторых вариантах осуществления антитело человека, описанное в настоящем описании, содержит константную область IgG человека. В некоторых вариантах осуществления антитело человека, описанное в настоящем описании, содержит константную область тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело человека, описанное в настоящем описании, содержит константную область IgG4 человека и легкую цепь к человека.

**[465]** В некоторых вариантах осуществления, когда является желательной эффекторная функция, выбирают антитело человека против B7-H4, содержащее константную область тяжелой цепи IgG1 человека или константную область тяжелой цепи IgG3 человека. В некоторых вариантах осуществления, когда эффекторная функция является нежелательной, выбирают антитело человека против B7-H4, содержащее

константную область тяжелой цепи IgG4 или IgG2 человека.

**[466]** В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению характеризуются конкретными функциональными признаками или свойствами антител. Например, антитела специфически связываются с B7-H4 человека. Как правило, антитело по настоящему изобретению связывается с B7-H4 с высокой аффинностью, например, с  $K_D$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее. Антитела против B7-H4 по настоящему изобретению обычно демонстрируют одну или несколько из следующих характеристик:

- (a) связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее; и/или
- (b) связывается с клетками СНО, трансфицированными B7-H4 (например, B7-H4 человека).

**[467]** В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $5 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $2 \times 10^{-8}$  М или менее, связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $5 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $4 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $3 \times 10^{-9}$  М или менее, связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $2 \times 10^{-9}$  М или менее, или связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $1 \times 10^{-9}$  М или менее.

**[468]** В данной области известны стандартные способы анализа для оценки способности антител связываться с B7-H4, включая, например, ELISA, вестер-блоттинг, RIA и проточную цитометрию. Кинетику связывания (например, аффинность связывания) антител также можно оценивать посредством стандартных способов анализа, известных в данной области, например, посредством ELISA, анализа Скэтчарда и анализа на системе Biacore®.

**[469]** Потенциальные терапевтические mAb должны не только связываться с их мишенями, но также должны быть свободны от "проблем, связанных с возможностью разработки", таких как низкая стабильность или высокие уровни агрегации. Авторы изобретения описывают нормативные величины для пяти показателей, которые, предположительно, вовлечены в проблемы, связанные с возможностью разработки: общая длина определяющих комплементарность областей (CDR), степень и величина гидрофобности поверхности, положительный заряд и отрицательный заряд в CDR, и асимметрия суммарных поверхностных зарядов тяжелой и легкой цепей. Пороговые значения для нормативных величин каждого свойства были получены из величин, наблюдаемых в CST, и для идентификации несоответствующих кандидатов предлагается система флажирования.

**[470]** Иллюстративное антитело против B7-H4 по изобретению включает B7-H4\_2F9 (также упоминаемое в настоящем описании как "родительское антитело B7-H4\_2F9", "родительское антитело 2F9" или "родительское антитело"), которое описано в патенте США № 8609816, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

**[471]** Потенциальные терапевтические mAb должны не только связываться с их мишенью, но также должны быть свободными от "проблем, связанных с возможностью

разработки," таких как низкая стабильность, высокие уровни агрегации, экспрессия на низком уровне, низкая растворимость, целостность ковалентных связей, конформационная и коллоидная нестабильность, высокая полиспецифичность и высокая иммуногенность.

[472] Таким образом, последовательность родительского антитела B7-H4\_2F9 анализировали в отношении показателей, предположительно вовлеченных в проблемы, связанные с возможностью разработки, например, таких как общая длина определяющих комплементарность областей (CDR), степень и величина гидрофобности поверхности, положительный заряд и отрицательный заряд в CDR, асимметрия в суммарных поверхностных зарядах тяжелой и легкой цепей и посттрансляционные модификации (PTM). Этот анализ проблем, связанных с возможностью разработки, для последовательности родительского антитела B7-H4\_2F9 выявил три потенциальных недостатка последовательности. В частности, последовательность родительского антитела B7-H4\_2F9 имела непарные остатки цистеина, последовательность изомеризации аспартата и участок окисления метионина. Каждый из этих трех недостатков последовательности мог приводить к потенциальным проблемам при разработке, таким как стабильность, эффективность и гомогенность антитела, и мог приводить к усложненному процессу последующей разработки.

[473] Для устранения потенциальных недостатков последовательности родительского антитела B7-H4\_2F9 было разработано и получено двадцать (20) вариантов B7-H4\_2F9, в которых были устранены эти потенциальные проблемы, связанные с возможностью разработки. Эти варианты антител включали B7-H4\_2F9V1, B7-H4\_2F9V2, B7-H4\_2F9V3, B7-H4\_2F9V4, B7-H4\_2F9V5, B7-H4\_2F9V6, B7-H4\_2F9V7, B7-H4\_2F9V8, B7-H4\_2F9V9, B7-H4\_2F9V10, B7-H4\_2F9V11, B7-H4\_2F9V12, B7-H4\_2F9V13, B7-H4\_2F9V14, B7-H4\_2F9V15, B7-H4\_2F9V16, B7-H4\_2F9V17, B7-H4\_2F9V18, B7-H4\_2F9V19 и B7-H4\_2F9V20. Каждый из 20 вариантов был охарактеризован в отношении связывания B7-H4, полиспецифичности и других свойств.

[474] Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность моноклональных антител против B7-H4 по изобретению приведены ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, приведенных ниже. Аминокислоты, охватывающие определяющие комплементарность области (CDR), как показано ниже, определены в соответствии с системой нумерации IMGT (См. IMGT<sup>®</sup>, the international ImMunoGeneTics information system<sup>®</sup>. Доступна через интернет: <http://www.imgt.org/>).

Вариабельные области B7-H4 2F9

[475] Все из двадцати родительских вариантов B7-H4 2F9 (т.е. с B7-H4\_2F9V1 по B7-H4\_2F9V20) обладают общей вариабельной областью легкой цепи (упоминаемой в настоящем описании как V<sub>L</sub> B7-H4\_2F9).

[476] В некоторых вариантах осуществления все антитела по изобретению содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

[477] V<sub>L</sub>-цепь B7-H4\_2F9\_V<sub>L</sub> (SEQ ID NO:50) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

EVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:  
50).

[478] VH-цепь B7-H4\_2F9\_родительское (SEQ ID NO:1) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS  
GR<sup>T</sup>DCADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RDGDYGM<sup>D</sup>VWGQGT  
TVTVSS (SEQ ID NO: 1).

[479] VH-цепь B7-H4\_2F9V1 (SEQ ID NO:5) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS<sup>GRTY</sup>  
YADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RDGDYGM<sup>D</sup>VWGQGT<sup>T</sup>TVTS  
S (SEQ ID NO: 5).

[480] VH-цепь B7-H4\_2F9V2 (SEQ ID NO:8) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS<sup>GRTY</sup>  
YADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RDADYGM<sup>D</sup>VWGQGT<sup>T</sup>TVTS  
S (SEQ ID NO: 8).

[481] VH-цепь B7-H4\_2F9V3 (SEQ ID NO:11) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS<sup>GRTY</sup>  
YADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RD<sup>TY</sup>AM<sup>D</sup>VWGQGT<sup>T</sup>TVTVSS  
(SEQ ID NO: 11).

[482] VH-цепь B7-H4\_2F9V4 (SEQ ID NO:14) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS<sup>GRTY</sup>  
YADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RDADYGL<sup>D</sup>VWGQGT<sup>T</sup>TVTS  
S (SEQ ID NO: 14).

[483] VH-цепь B7-H4\_2F9V5 (SEQ ID NO:17) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS<sup>GRTY</sup>  
YADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RD<sup>TY</sup>AL<sup>D</sup>VWGQGT<sup>T</sup>TVTVSS  
(SEQ ID NO: 17).

[484] VH-цепь B7-H4\_2F9V6 (SEQ ID NO:20) содержит или состоит из аминокислотной последовательности содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGS  
GR<sup>T</sup>DYADSVKGRFTISRDN<sup>S</sup>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<sup>A</sup>RDGDYGM<sup>D</sup>VWGQGT

TVTVSS (SEQ ID NO: 20).

**[485]** VH-цепь B7-H4\_2F9V7 (SEQ ID NO:22) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDADYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22).

**[486]** Вариабельная область тяжелой цепи B7-H4\_2F9V7 также обозначается в настоящем описании как вариабельная область тяжелой цепи XMT-1603.

**[487]** VH-цепь B7-H4\_2F9V8 (SEQ ID NO:24) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDADYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24).

**[488]** VH-цепь B7-H4\_2F9V9 (SEQ ID NO:26) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYAMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 26).

**[489]** VH-цепь B7-H4\_2F9V10 (SEQ ID NO:28) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYALDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 28).

**[490]** VH-цепь B7-H4\_2F9V11 (SEQ ID NO:30) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 AADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 30).

**[491]** VH-цепь B7-H4\_2F9V12 (SEQ ID NO:32) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 AADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDADYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 32).

**[492]** VH-цепь B7-H4\_2F9V13 (SEQ ID NO:34) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 AADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDADYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 34).

**[493]** VH-цепь B7-H4\_2F9V14 (SEQ ID NO:36) содержит или состоит из аминокислотной последовательности:



EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 AADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDTYAMDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 36).

[494] VH-цепь B7-H4\_2F9V15 (SEQ ID NO: 38) содержит или состоит из  
 аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTD  
 AADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDTYALDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 38).

[495] VH-цепь B7-H4\_2F9V16 (SEQ ID NO: 40) содержит или состоит из  
 аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTDS  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDGDYGMDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 40).

[496] VH-цепь B7-H4\_2F9V17 (SEQ ID NO: 42) содержит или состоит из  
 аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTDS  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDADYGMDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 42).

[497] VH-цепь B7-H4\_2F9V18 (SEQ ID NO: 44) (также упоминаемая в настоящем  
 описании как XMT-1604 VH) содержит или состоит из аминокислотной  
 последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTDS  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDADYGLDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 44).

[498] Вариабельную область тяжелой цепи B7-H4\_2F9V18 также упоминают в  
 настоящем описании как вариабельная область тяжелой цепи XMT-1604.

[499] VH-цепь B7-H4\_2F9V19 (SEQ ID NO: 46) содержит или состоит из  
 аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTDS  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDTYAMDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 46).

[500] VH-цепь B7-H4\_2F9V20 (SEQ ID NO: 48) содержит или состоит из  
 аминокислотной последовательности:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGRTDS  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARDTYALDVWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 48).

## CDR

[501] В таблице I ниже обобщенно представлены CDR антител против B7-H4 по  
 изобретению.

## ТАБЛИЦА I: АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

# **ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ ОБЛАСТЕЙ ТЯЖЕЛОЙ И ЛЕГКОЙ ЦЕПЕЙ.**

| Антитело                            | CDR1     | SEQ<br>ID<br>NO: | CDR2    | SEQ<br>ID<br>NO: | CDR3               | SEQ<br>ID<br>NO: |
|-------------------------------------|----------|------------------|---------|------------------|--------------------|------------------|
| B7-H4_2F9<br>родительское_vH        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDGDYGM DV</u> | 4                |
| B7-H4_2F9V1                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDGDYGM DV</u> | 4                |
| B7-H4_2F9V2                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGM DV</u> | 10               |
| B7-H4_2F9V3                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAM DV</u>  | 13               |
| B7-H4_2F9V4                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGL DV</u> | 16               |
| B7-H4_2F9V5                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAL DV</u>  | 19               |
| B7-H4_2F9V6                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDGDYGM DV</u> | 4                |
| XMT-1603<br>B7-H4_2F9V7             | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGM DV</u> | 10               |
| B7-H4_2F9V8                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGL DV</u> | 16               |
| B7-H4_2F9V9                         | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAM DV</u>  | 13               |
| B7-H4_2F9V10                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAL DV</u>  | 19               |
| B7-H4_2F9V11                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDGDYGM DV</u> | 4                |
| B7-H4_2F9V12                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGM DV</u> | 10               |
| B7-H4_2F9V13                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGL DV</u> | 16               |
| B7-H4_2F9V14                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAM DV</u>  | 13               |
| B7-H4_2F9V15                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAL DV</u>  | 19               |
| B7-H4_2F9V16                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDGDYGM DV</u> | 4                |
| B7-H4_2F9V17                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGM DV</u> | 10               |
| XMT-1604<br>B7-H4_2F9V18            | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDADYGL DV</u> | 16               |
| B7-H4_2F9V19                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAM DV</u>  | 13               |
| B7-H4_2F9V20                        | GFIVSRNY | 2                | IYGSGRT | 3                | <u>ARDTYAL DV</u>  | 19               |
| B7-H4_2F9<br><u>родительское_vL</u> | QSVSSSY  | 53               | GAS     | 54               | QQYGSSPLYT         | 55               |

**[502]** В данной области хорошо известно, что домен CDR3, независимо от домена(ов) CDR1 и/или CDR2, отдельно может определять специфичность связывания антитела против B7-H4 в отношении когнатного антигена и что может быть предсказуемо

получено множество антител, обладающие одинаковую специфичность связывания, на основе общей последовательности CDR3.

**[503]** В некоторых вариантах осуществления антитела содержит один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из не являющегося человеческим антитела, такого как антитело мыши или крысы, где моноклональное антитело способно специфически связываться с B7-H4. В некоторых вариантах осуществления такие антитела по изобретению, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепей из не являющегося человеческим антитела(антител), способны конкурировать за связывание с соответствующим родительским не являющимся человеческим антителом; (b) сохранять его функциональные характеристики; (c) связываться тем же эпитопом; и/или (d) иметь сходную с ним аффинность связывания.

**[504]** В некоторых вариантах осуществления предусматриваются моноклональные антитела, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из первого антитела человека, например, такого как антитело человека, полученное от не являющегося человеком животного, где первое антитело человека способно специфически связываться с B7-H4 и где домен CDR3 из первого антитела человека заменяет домен CDR3 в антителе человека, который лишен специфичности связывания с B7-H4, с образованием второго антитела человека, которое способно специфически связываться с B7-H4. В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие один или несколько доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепей из первого антитела человека, (a) способны конкурировать за связывание с соответствующим родительским первым антителом человека; (b) сохранять его функциональные характеристики; (c) связываться с тем же эпитопом; и/или (d) иметь сходную с ним аффинность связывания.

#### **Константные области B7-H4 2F9**

**[505]** Родительское антитело B7-H4 2F9 и двадцать вариантов по изобретению имеют константную область легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 51).

**[506]** Константную область легкой цепи B7-H4 2F9 (SEQ ID NO:51) также упоминают в настоящем описании как LC B7-H4 2F9.

**[507]** В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению содержат легкую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи и аминокислотной последовательности константной области легкой цепи. Легкие цепи антитела (вариабельные и константные области) по изобретению содержат или состоят из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[508]** Родительское антитело B7-H4 2F9 и двадцать вариантов по изобретению имеют константную область тяжелой цепи IgG1, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 6). Константную область тяжелой цепи IgG1 B7-H4 2F9 (SEQ ID NO:6) также упоминают в настоящем описании как HC B7-H4 2F9.

**[509]** В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи IgG1, содержащая или состоящая из SEQ ID NO: 6, дополнительно содержит одну или несколько аминокислот на N-конце или C-конце. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи IgG1 содержит C-концевой лизин.

**[510]** В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению содержат тяжелую цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности вариательной области тяжелой цепи и аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи. Тяжелые цепи антител (вариательные и константные области) по изобретению описаны в таблице II и списке последовательностей, предоставленном с настоящим описанием.

**[511]** В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут содержать константную область тяжелой цепи IgG2, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 57).

**[512]** В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут содержать константную область тяжелой цепи IgG4, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности:  
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58).

**Таблица II. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи антитела (вариательная область тяжелой цепи+константная область тяжелой цепи IgG1)**

| Тяжелая цепь              | SEQ ID NO: | Тяжелая цепь | SEQ ID NO: |
|---------------------------|------------|--------------|------------|
| B7-H4_2F9 родительское_vH | 56         | B7-H4_2F9V11 | 31         |

|              |    |                          |    |
|--------------|----|--------------------------|----|
| B7-H4_2F9V1  | 7  | B7-H4_2F9V12             | 33 |
| B7-H4_2F9V2  | 9  | B7-H4_2F9V13             | 35 |
| B7-H4_2F9V3  | 12 | B7-H4_2F9V14             | 37 |
| B7-H4_2F9V4  | 15 | B7-H4_2F9V15             | 39 |
| B7-H4_2F9V5  | 18 | B7-H4_2F9V16             | 41 |
| B7-H4_2F9V6  | 21 | B7-H4_2F9V17             | 43 |
| B7-H4_2F9V7  | 23 | XMT-1604<br>B7-H4_2F9V18 | 45 |
| B7-H4_2F9V8  | 25 | B7-H4_2F9V19             | 47 |
| B7-H4_2F9V9  | 27 | B7-H4_2F9V20             | 49 |
| B7-H4_2F9V10 | 29 |                          |    |

### Конкретные варианты осуществления

**[513]** В другом варианте осуществления антитело против B7-H4 по настоящему изобретению содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными предпочтительным антителам, описанными в настоящем описании, где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител против B7-H4 по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, содержащим переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

(а) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 22, 30, 40 и 42;

(b) переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50;

(с) антитело связывается с B7-H4 человека с  $K_D$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее; и

(d) антитело связывается с клетками СНО человека, трансфицированными B7-H4.

**[514]** В различных вариантах осуществления антитело может представлять собой, например, антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

**[515]** В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичными последовательностям, указанным выше. Антитело против B7-H4, имеющее области VH и VL, обладающие высокой (т.е. 80% или более) гомологией с областями VH и VL последовательностей, указанных выше, могут быть получены посредством мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредуемого мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотные последовательности, указанные под SEQ ID NO: 44, 22, 30, 40 и 42, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела в

отношении сохранения функции (т.е. функций, указанных в (с) и (d) выше), с использованием функциональных способов анализа, описанных в настоящем описании.

**[516]** В предпочтительном варианте осуществления последовательность CDR2 варибельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 44, 22, 30, 40 и 42 и их консервативных модификаций; и последовательность CDR2 варибельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 и ее консервативные модификации. В другом предпочтительном варианте осуществления последовательность CDR1 варибельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 44, 22, 30, 40 и 42 и их консервативных модификаций; и последовательность CDR1 варибельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 и ее консервативные модификации.

**[517]** В различных вариантах осуществления антитело может представлять собой, например, антитела человека, гуманизированные антитела или химерные антитела.

**[518]** В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с тем же эпитопом на B7-H4, что и любое из моноклональных антител против B7-H4 по настоящему изобретению (т.е. антитела, которые обладают способностью перекрестно конкурировать за связывание B7-H4 с любым из моноклональных антител по настоящему изобретению).

**[519]** Таким образом, другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, содержащим варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 22, 30, 40 и 42, соответственно, и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, 54 и 55, соответственно.

**[520]** Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам против B7-H4 или их антигенсвязывающим частям, содержащим варибельную область тяжелой цепи, содержащую: (a) область CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2; или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 2; (b) область CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3; или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 3; (c) область CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 10 или 4; или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 16, 10 или 4.

**[521]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем

описании, содержат тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 23, 31, 41 или 43, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 52.

**[522]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат комбинацию аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из (i) аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и аминокислотной последовательности легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52; (ii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и аминокислотной последовательности легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52; (iii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, и аминокислотной последовательности легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52; (iv) аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и аминокислотной последовательности легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50; и (v) аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, и аминокислотной последовательности легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[523]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[524]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере

на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[525]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, и аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[526]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[527]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, и аминокислотную последовательности легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[528]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании содержат тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 23, 31, 41 или 43, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

**[529]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат комбинацию аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из (i) аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 45 и аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52; (ii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52; (iii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52; (iv) аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52; и (v) аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 и аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52.

**[530]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 45 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52.



**[531]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52.

**[532]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52.

**[533]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52.

**[534]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52.

**[535]** Антитела, описанные в настоящем описании, содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, 22, 30, 40 или 42,

и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 50.

**[536]** В некоторых вариантах осуществления три CDR тяжелой цепи антител, описанных в настоящем описании, включают определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO: 2; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDRH2), которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO: 3; и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDRH3), которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 10 или 4; и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, 23, 31, 41 или 43.

**[537]** Три CDR легкой цепи антител, описанных в настоящем описании, включают определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO: 53; определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDRL2), которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO:

54; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDRL3), которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO: 55.

**[538]** Антитела включают комбинацию последовательностей CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи, которые включают CDRH1, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO: 2; CDRH2, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, содержащей SEQ ID NO: 3; CDRH3, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 10 или 4; CDRL1, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53; CDRL2, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную последовательности SEQ ID NO: 54; и CDRL3, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную SEQ ID NO: 55; и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, 23, 31, 41 или 43.

**[539]** Три CDR тяжелой цепи антител, описанных в настоящем описании, включают CDRH1, которая включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, CDRH2, которая включает аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3; и CDRH3, которая включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 или 16; и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45 или 23.

**[540]** Три CDR легкой цепи антител, описанных в настоящем описании, включают CDRL1, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; CDRL2, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDRL3, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. Антитела, описанные в настоящем описании, включают комбинацию последовательностей CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи, которая включает; CDHR1, которая включает аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2; CDRH2, которая включает аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3; CDRH3, которая включает аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 10 или 16; CDRL1, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; CDRL2,

которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDRL3, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 45 или 23. Антитела, описанные в настоящем описании, содержат комбинацию аминокислотных последовательностей определяющей комплементарности области тяжелой цепи и определяющей комплементарности области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из (i) аминокислотной последовательности CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности CDRH3 SEQ ID NO: 16, аминокислотной последовательности CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотной последовательности CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотной последовательности CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 45; (ii) аминокислотной последовательности CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности CDRH3 SEQ ID NO: 10, аминокислотной последовательности CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотной последовательности CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотной последовательности CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; (iii) аминокислотной последовательности CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности CDRH3 SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотной последовательности CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотной последовательности CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 31; (iv) аминокислотной последовательности CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности CDRH3 SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотной последовательности CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотной последовательности CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и (v) аминокислотной последовательности CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности CDRH3 SEQ ID NO: 10, аминокислотной последовательности CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотной последовательности CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотной последовательности CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 43.

**[541]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 45.

[542] В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 54, аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 55 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 23.

[543] В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 54 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 55.

[544] В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 54 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 55.

[545] В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 53, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 54 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 55.

[546] Предпочтительные антитела, описанные в настоящем описании, включают, например, B7-H4-2F9V7 (также упоминаемое в настоящем описании как антитело XMT 1603) и B7-H4-2F9V18 (также упоминаемое в настоящем описании как антитело XMT 1604). Эти антитела демонстрируют специфичность в отношении B7-H4 человека, и было показано, что они ингибируют функциональную активность B7-H4 *in vitro*.

#### **Получение антител против B7-H4**

[547] Антитела против B7-H4 получают, например, с использованием способов, описанных в Примерах настоящего описания. Альтернативно или дополнительно, для получения моноклональных антител, направленных на B7-H4, или на его производные, фрагменты, аналоги, гомологи или ортологи, можно использовать различные методики, известные в данной области (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); Cole, et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96; Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030; Cole, et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96; каждая из

которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

**[548]** Моноклональные антитела, описанные в настоящем описании, включают полностью человеческие антитела или гуманизированные антитела. Эти антитела являются пригодными для введения человеку без возникновения иммунного ответа у человека против введенного иммуноглобулина. Гуманизированное или полностью человеческое антитело против В7-Н4 разрабатывают, например, с использованием способов фагового дисплея с антителами, содержащими только человеческие последовательности. Такие подходы хорошо известны в данной области, например, из WO92/01047 и патента США № 6521404, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

**[549]** Антитела очищают хорошо известными способами, такими как аффинная хроматография с использованием белка А или белка G, которая в основном обеспечивает IgG-фракцию иммунной сыворотки. После этого, или альтернативно, специфический антиген, который является мишенью искомого иммуноглобулина, или его эпитоп, может быть иммобилизован на колонке для очистки иммунного специфического антитела посредством иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов описана, например, D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28; включенная в настоящее описание в качестве ссылки).

**[550]** Изобретение также включает фрагменты  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  и  $F_{(ab')_2}$  против В7-Н4, или фрагменты против В7-Н4, одноцепочечные антитела против В7-Н4, мультиспецифические антитела, в которых по меньшей мере одно плечо связывает В7-Н4, и гетероконъюгаты антител против В7-Н4.

**[551]** Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных антигенов. В данном случае, одна из специфичностей связывания направлена на В7-Н4. Второй мишенью связывания является любой другой антиген, в том числе белок клеточной поверхности, или рецептор, или субъединица рецептора.

**[552]** Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционно, рекомбинантное продуцирование биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулина, где две тяжелых цепи обладают разной специфичностью (Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)).

**[553]** Биспецифические антитела можно получать в качестве полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела  $F_{(ab')_2}$ ). Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител описаны в литературе.

**[554]** Предусматриваются антитела с более чем двумя валентностями. Например, можно получать триспецифические антитела. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

**[555]** Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами, по меньшей мере один из которых происходит из белкового антигена, описанного в настоящем описании. Альтернативно направленное против антигена плечо молекулы иммуноглобулина можно комбинировать с плечом, которое

связывается с триггерной молекулой на лейкоците, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2, CD3, CD28 или B7), или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), так чтобы фокусировать механизмы клеточной защиты на клетке, экспрессирующей конкретный антиген. Биспецифические антитела также можно использовать для направления цитотоксических агентов к клеткам, которые экспрессируют конкретный антиген. Эти антитела имеют антигенсвязывающее плечо и плечо, которое связывает цитотоксическое средство или хелатор радионуклидов, такой как EOTUBE, DPTA, DOTA или TETA. Другое представляющее интерес биспецифическое антитело связывает белковый антиген, описанный в настоящем описании и, кроме того, связывает тканевой фактор (TF).

**[556]** Также в объем настоящего изобретения входят гетероконъюгаты антител. Гетероконъюгаты антител состоят из двух ковалентно связанных антител. Такие антитела были предложены, например, для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (см. патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (см. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Предусматривается, что антитела можно получать *in vitro* с использованием известных способов синтетической химии белков, включая способы, вовлекающие сшивающие агенты. Например, иммунотоксины можно конструировать с использованием реакции дисульфидного обмена или путем образования простой тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат, и реагенты, описанные, например, в патенте США № 4676980.

**[557]** Может быть желательной модификация антитела, описанного в настоящем описании, в отношении эффекторной функции для повышения, например, эффективности антитела в отношении лечения заболеваний и нарушений, ассоциированных с аберрантной экспрессией и/или активностью B7-H4. Например, остаток(и) цистеина может быть встроен в Fc-область, тем самым позволяя образование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность к интернализации и/или увеличенное опосредуемое комплементом уничтожение клеток и антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Альтернативно может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-области и, таким образом, может иметь усиленные способности к лизису комплемента и ADCC (см. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

#### *Антитела с встроенным цистеином против B7-H4*

**[558]** В некоторых вариантах осуществления антитело с встроенным цистеином против B7-H4 направляет конъюгаты, содержащие пептидный линкер, в конкретные ткани, клетки или области в клетке. В некоторых вариантах осуществления антитело с встроенным цистеином против B7-H4 содержит встроенный цистеин.

**[559]** В некоторых вариантах осуществления антитело с встроенным цистеином против B7-H4 или фрагмент антитела представляет собой антитело против B7-H4 или

фрагмент антитела, в котором одна или несколько аминокислот соответствующего родительского антитела или фрагмента антитела (например, соответствующего антитела против В7-Н4 дикого типа или фрагмента антитела) заменены на цистеин (например, встроенный цистеин). В некоторых вариантах осуществления родительское антитело против В7-Н4 или фрагмент антитела являются такими, как описано в настоящем описании.

**[560]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 модифицировано для получения антитела с встроенным цистеином. В некоторых вариантах осуществления антитело с встроенным цистеином против В7-Н4 или фрагмент антитела сохраняет способность связать антиген, которой обладает его соответствующее антитело против В7-Н4 или фрагмент антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело с встроенным цистеином или фрагмент антитела способны связываться с одним или несколькими антигенами соответствующего антитела против В7-Н4 или фрагмента антитела дикого типа.

**[561]** В некоторых вариантах осуществления встроенный цистеин не является частью внутрицепочечного или межцепочечного дисульфидного элемента. В некоторых вариантах осуществления встроенный цистеин содержит свободную тиольную группу, которая является реакционноспособной с электрофильной функциональностью. В некоторых вариантах осуществления встроенный цистеин (например, его свободная тиольная группа) на поверхности антитела против В7-Н4 или фрагмента антитела может позволять конъюгацию антитела против В7-Н4 или фрагмента антитела с частью линкер-лекарственное средство, содержащей реагирующую с тиолом группу (например, малеинимид или галоацетил).

**[562]** Понятно, что замена одной или нескольких не являющихся цистеином аминокислот в антителе против В7-Н4 или фрагменте антитела на цистеин может обеспечивать один или несколько встроенных остатков цистеина в качестве доступных участков для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления путем замены не являющейся цистеином аминокислоты в антителе против В7-Н4 или фрагменте антитела на цистеин размещают реакционноспособную тиольную группу в качестве доступного участка для антитела или фрагмента антитела, и она может использоваться для конъюгации антитела или фрагмента антитела с другими частями (например, части лекарственного средства или части линкер-лекарственное средство) и для получения конъюгата по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления аминокислоту V205 (нумерация Kabat или EU) легкой цепи или A118 или S442 тяжелой цепи (нумерации EU) родительского антитела против В7-Н4 фрагмента антитела заменяют на цистеин. В некоторых вариантах осуществления антитела с встроенным цистеином можно получать, как описано, например, в патенте США № 7521541.

**[563]** В некоторых вариантах осуществления антитело с встроенным цистеином против В7-Н4 конъюгировано с частью линкер-лекарственное путем образования ковалентной связи через сульфгидрильную группу встроенного цистеина и функциональную группу части линкер-лекарственное средство.

*Модифицированные антитела против В7-Н4*

**[564]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 представляет собой модифицированное антитело против В7-Н4.

**[565]** В некоторых вариантах осуществления модифицированного антитела против В7-Н4 \* обозначает прямое или не прямое присоединение к остальной части модифицированного антитела против В7-Н4. В некоторых вариантах осуществления S" представляет собой сахар или дериватизированный сахар. В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой части линкер-лекарственное средство,

**[566]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4 перед конъюгацией содержит часть производного сахара \*—S"—A" .

**[567]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4 содержит группу аспарагина в области 290-305 (например, на N297; нумерация EU). В некоторых вариантах осуществления часть производного сахара прямо или непрямо связана с группой аспарагина (например, на N297).

**[568]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4 перед конъюгацией содержит часть модифицированного GlcNAc \*—GlcNAc—S"—A", где GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин.

**[569]** В некоторых вариантах осуществления часть модифицированного GlcNAc соединена с остальной частью модифицированного антитела против В7-Н4 через положение C1 в GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления часть модифицированного GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

**[570]** В некоторых вариантах осуществления часть модифицированного GlcNAc прямо или непрямо соединена с группой аспарагина (например, на N297).

**[571]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4 конъюгировано с частью линкер-лекарственное средство через ковалентную связь, образованную между A" и функциональной группой части линкер-лекарственное средство.

**[572]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4 по настоящему изобретению получают посредством процесса, включающего:

(а) приведение в контакт гликопротеина (например, антитела против гликана В7-Н4), содержащего антитело против В7-Н4 и часть корового GlcNAc, с эндогликозидазой, тем самым получая промежуточное антитело, содержащее антитело и часть концевой GlcNAc и, необязательно, часть концевой GlcNAc дополнительно содержит фукозу; и

(b) приведение в контакт промежуточного антитела с соединением, имеющим структуру P"—S"—A" , в присутствии гликозилтрансферазы, тем самым получая модифицированное антитело против В7-Н4, содержащее антитело и часть модифицированного GlcNAc, \*—GlcNAc—S"—A", и необязательно часть модифицированного GlcNAc соединена с остальной частью модифицированного антитела



против В7-Н4 в положении C1 GlcNAc; где

GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин;

S" представляет собой сахар или дериватизированный сахар;

A" представляет собой азидо, кето или алкинил; и

P" представляет собой уридиндифосфат (UDP), гуанозиндифосфат (GDP) или цитидиндифосфат (CDP).

[573] В некоторых вариантах осуществления стадии (a) и (b) проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления стадии (a) и (b) проводят одновременно.

[574] В некоторых вариантах осуществления гликан антитела содержит смесь гликоформ G0, G1, G2, G0F, G1F, G2F и M5 (например, гликоформы, представленные на фиг.1).

[575] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело (mAb).

[576] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgA-, IgD-, IgE-, IgG- или IgM-антитело.

[577] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG-антитело, например, IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG1-антитело.

[578] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, и гликан антитела содержит одну или несколько частей корового GlcNAc.

[579] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, и гликан содержит одну или несколько частей корового GlcNAc, соединенных с каждой тяжелой цепью антитела.

[580] В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

[581] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело и гликан антитела содержит две или более частей корового GlcNAc, соединенных с полноразмерным антителом.

[582] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, и гликан антитела содержит две части корового GlcNAc, соединенных с полноразмерным антителом.

[583] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из двух или более частей корового GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

[584] В некоторых вариантах осуществления каждая из двух или более частей корового GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

[585] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечное антитело или фрагмент антитела против В7-Н4 (например, Fab- или Fc-фрагмент), гликан антитела содержит одну или несколько частей корового GlcNAc

(который необязательно дополнительно содержит фукозу), соединенных с антителом.

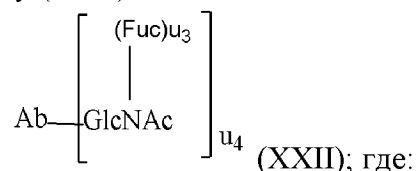
**[586]** В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc соединена с положением антитела, в котором часть корового GlcNAc не закрывает в значительной степени участок связывания антигена на антителе.

**[587]** В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc соединена с Fc-фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc соединена с CH-доменом. В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc соединена с Fab- или Fc-фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc соединена через N-гликозидную связь с атомом азота амида в боковой цепи аминокислоты аспарагина антитела. В некоторых вариантах осуществления часть корового GlcNAc соединена с нативным участком N-гликозилирования на антителе.

**[588]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG-антитело, и часть корового GlcNAc соединена с нативным участком N-гликозилирования IgG.

**[589]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG-антитело, и часть корового GlcNAc соединена с нативным участком N-гликозилирования IgG (например, участок N-гликозилирования N297 IgG). В некоторых вариантах осуществления участок N-гликозилирования N297 находится в консервативной Fc-области тяжелой цепи IgG-антитела на аспарагине в области 290-305 (например, на N297).

**[590]** В некоторых вариантах осуществления промежуточное антитело имеет формулу (XXII):



Ab представляет собой антитело против B7-H4; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин; Fuc представляет собой фукозу;  $u_3$  равен 0 или 1; и  $u_4$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 16.

**[591]** В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $u_4$  равен 2.

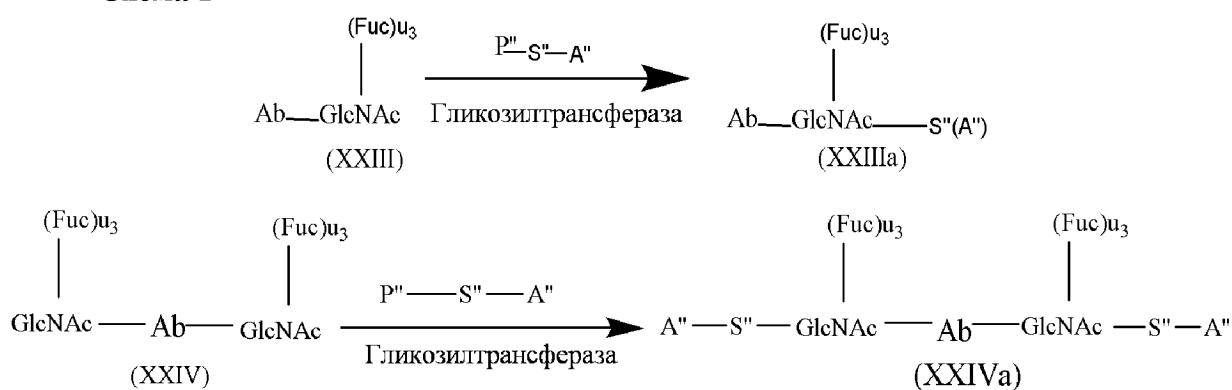
**[592]** В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну часть корового GlcNAc (например,  $u_4$  равен 1). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две части корового GlcNAc (например,  $u_4$  равен 2).

**[593]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против B7-H4 получают посредством процесса, приведенного на схеме 1. Как показано ниже, приведение в контакт промежуточного антитела формулы (XXIII), содержащего одну часть

концевого GlcNAc, с соединением, имеющим структуру  $P''-S''-A''$ , в присутствии гликозилтрансферазы обеспечивает модифицированное антитело против B7-H4, содержащее одну часть модифицированного GlcNAc (например, модифицированного антитела против B7-H4 формулы (XXIIIa)).

**[594]** В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против B7-H4 получают путем приведения в контакт промежуточного антитела формулы (XXIV), содержащего две части концевого GlcNAc, с соединением, имеющим структуру  $P''-S''-A''$ , в присутствии гликозилтрансферазы, с получением модифицированного антитела против B7-H4, содержащего две части модифицированного GlcNAc (например, модифицированное антитело против B7-H4 формулы (XXIVa)).

**Схема 1**



где  $u_3$ , Ab,  $S''$ ,  $A''$  и  $P''$  являются такими, как определено в настоящем описании.

**[595]** В некоторых вариантах осуществления антитело, подлежащее модификации в процессе согласно настоящему изобретению, содержит гликан, причем указанный гликан содержит часть корового GlcNAc, т.е. часть GlcNAc, которая присутствует на невозстанавливаемом конце гликана. В некоторых вариантах осуществления гликан содержит одну или несколько сахаридных частей и может быть линейным или разветвленным.

**[596]** В некоторых вариантах осуществления при реакции с эндогликозидазой может быть получено промежуточное антитело, которое содержит часть концевого GlcNAc (например, промежуточное антитело формулы (XXIII) или (XXIV)).

**[597]** В некоторых вариантах осуществления стадия (a) процесса (дегликозилирования или укорочения) является такой, как показано на фиг.2, где смесь гликоформ антител G2F, G1F, G0F, G2, G1, G0 и M5 (например, см. фиг.1), и возможно дополнительных гликоформ (например, триантеннарные гликаны), конвертируют в промежуточные антитела, содержащие часть концевого GlcNAc, которая необязательно содержит фукозу (например,  $u_3$  равен 0 или 1).

**[598]** В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой эндогликозидазу Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию.

**[599]** В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49 или их комбинацию.

**[600]** В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo S или Endo SH, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo SH.

**[601]** В некоторых вариантах осуществления стадия (b) процесса (образование модифицированного антитела против B7-H4) является такой, как показано на фиг.3, где промежуточное антитело содержит моноклональное антитело (mAb) и часть концевой GlcNAc (которая необязательно содержит фукозу (например,  $u_3$  равен 0 или 1)) на каждой тяжелой цепи моноклонального антитела (mAb). В некоторых вариантах осуществления на стадии (b) часть концевой GlcNAc конвертируют в часть модифицированного GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления указанное конвертирование можно осуществлять посредством реакции части концевой GlcNAc с соединением  $P''-S''-A''$  в присутствии гликозилтрансферазы.

**[602]** В некоторых вариантах осуществления соединение  $P''-S''-A''$  представляет собой GalNAz-UDP (например, 4-AzGalNAc-UDP). В некоторых вариантах осуществления часть концевой GlcNAc представляет собой \*-GlcNAc-GalNAz или \*-GlcNAc(Fuc)-GalNAz, где \* обозначает присоединение к остальной части модифицированного антитела против B7-H4.

**[603]** В некоторых вариантах осуществления стадии дегликозилирования/укорочения и формирования модифицированного антитела против B7-H4 проводят последовательно.

**[604]** В некоторых вариантах осуществления стадии дегликозилирования/укорочения и формирования модифицированного антитела против B7-H4 проводят одновременно.

**[605]** В некоторых вариантах осуществления процесс получения модифицированного антитела против B7-H4 проводят в подходящем буферном растворе, например, забуференном солевом растворе (например, фосфатно-солевом буфере, Tris-забуференном солевом растворе), цитрате, HEPES, Tris и глицине. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS) или Tris-забуференный солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS).

**[606]** В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 4 до приблизительно 50°C. В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 45°C. В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 40°C. В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при температуре в диапазоне от

приблизительно 30 до приблизительно 37°C. В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при температуре приблизительно 30°C. В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при температуре 30°C.

**[607]** В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при величине pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 9 (например, от приблизительно 5,5 до приблизительно 8,5, от приблизительно 6 до приблизительно 8, или от приблизительно 7 до приблизительно 8). В некоторых вариантах осуществления процесс проводят при величине pH приблизительно 7,4.

**[608]** В некоторых вариантах осуществления процесс получения модифицированного антитела против B7-H4 является таким, как показано на фиг.4.

**[609]** В некоторых вариантах осуществления процесс получения модифицированного антитела против B7-H4 включает:

(a) приведение в контакт гликопротеина (например, гликана антитела против B7-H4), содержащего антитело против B7-H4 и часть корового GlcNAc, соединенную с участком N297 антитела, с эндогликозидазой Endo SH, тем самым получая промежуточное антитело, содержащее часть концевой GlcNAc; и

(b) приведение в контакт промежуточного антитела с 4-AzGalNAc-UDP в присутствии фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, тем самым получая модифицированное антитело против B7-H4, содержащее часть модифицированного GlcNAc;

где стадии (a) и (b) проводят одновременно.

**[610]** В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo SH, слитую конструкцию между двумя эндогликозидазами: Endo S и Endo H, связанными Gly-богатым спейсером, содержащим внутреннюю 6xHis-метку, с общей молекулярной массой 139 кДа.

**[611]** В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT содержит N-концевую 6xHis-метку и имеет общую молекулярную массу 45,7 кДа. В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, содержащий N-концевую 6xHis-метку, происходит из *Trichopulsia ni*.

**[612]** В некоторых вариантах осуществления процесс проводят в буфере PBS при величине pH приблизительно 7,4 и при температуре приблизительно 30°C.

Эндогликозидазы

**[613]** Эндогликозидазы представляют собой ферменты, которые способны расщеплять внутренние гликозидные связи в гликановых структурах, тем самым ремоделируя или укорачивая гликановую структуру. Например, эндогликозидазы могут использоваться для облегчения гомогенизации гетерогенных популяций гликанов, когда они осуществляют расщепление в прогнозируемых участках в консервативных областях гликанов. Один класс эндогликозидаз включает эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы (EC 3.2.1.96, широко известные как Endo S или ENG-азы) - класс гидролитических ферментов, который удаляет N-гликаны из гликопротеинов посредством гидролиза  $\beta$ -1,4-гликозидной связи в коровой структуре N,N'-диацетилхитобиозы (как описано в Wong et al. Chem. Rev.

2011, 111, 4259, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), оставляя единственный коровий N-связанный остаток GlcNAc. Эндо- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы часто встречаются в природе с распространенными хеомэнзиматическими вариантами, включающими Endo D, которая специфична к структурам с малым содержанием маннозы; Endo A и Endo H, которые являются специфичными к структурам с высоким содержанием маннозы; подтипы Endo F с диапазоном от структур с высоким содержанием маннозы до биантеннарного комплекса; и Endo M, которая может расщеплять большинство структур N-гликана (с высоким содержанием маннозы/комплексного типа/гибридного типа), за исключением фукозилированных гликанов и гидролитическая активность которой в отношении типа олигосахаридов с высоким содержанием маннозы является значительно более высокой, чем в отношении олигосахаридов комплексного и гибридного типа. В некоторых вариантах осуществления эти ENG-азы демонстрируют специфичность в отношении дистальной структуры N-гликана, но не белка, на котором она находится, что делает их пригодными для отщепления большинства N-связанных гликанов от гликопротеинов в нативных условиях.

**[614]** В некоторых вариантах осуществления эндогликозидазы F1, F2 и F3 являются пригодными для дегликозилирования нативных белков. Специфичность в отношении связей у Endo F1, F2 и F3 лежит в основе общей стратегии дегликозилирования белков, которая может удалять все классы N-связанных олигосахаридов без денатурации белка. В некоторых вариантах осуществления биантеннарные и триантеннарные структуры могут быть немедленно удалены посредством эндогликозидаз F2 и F3, соответственно. В некоторых вариантах осуществления олигоманнозные и гибридные структуры могут быть удалены посредством Endo F1.

**[615]** Endo S представляет собой секретируемую эндогликозидазу из *Streptococcus pyogenes*, и также она принадлежит семейству 18 гликозидгидролаз, как описано Collin et al. (EMBO J., 2001, 20, 3046), которая включена в настоящем описании в качестве ссылки в полном объеме. В противоположность ENG-азам, упоминаемым выше, Endo S имеет более определенную специфичность и является специфичной к расщеплению только консервативного N-гликана в Fc-домене IgG человека (на сегодняшний день другой субстрат не идентифицирован), что указывает на то, что белок-белковое взаимодействие между ферментом и IgG обеспечивает эту специфичность.

**[616]** Endo S49, также известная как Endo S2, описана в WO 2013/037824, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, выделена из *Streptococcus pyogenes* NZ131 и является гомологом Endo S. Endo S49 имеет специфическую эндогликозидазную активность в отношении нативного IgG и расщепляет большее разнообразие гликанов Fc, чем Endo S.

**[617]** Endo SH представляет собой слитую конструкцию между двумя эндогликозидазами, Endo S и Endo H, связанными Gly-богатым спейсером. Endo SH специфически расщепляет N-связанные гликаны между двумя частями N-

ацетилглюкозамина (GluNAc) в коровой области цепи гликана.

**[618]** В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза для дегликозилирования антитела представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3, Endo H, Endo M, Endo A или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза для дегликозилирования антитела представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3, Endo H или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2 или Endo S49.

**[619]** В некоторых вариантах осуществления, когда гликан, подлежащий укорочению, представляет собой диантеннарную структуру комплексного типа, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию.

**[620]** В некоторых вариантах осуществления, когда гликопротеин представляет собой антитело против B7-H4 и олигосахарид, подлежащий укорочению, представляет собой диантеннарную структуру комплексного типа и присутствует в консервативном участке N-гликозилирования IgG на N297, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49 или их комбинацию.

**[621]** В некоторых вариантах осуществления, когда гликопротеин представляет собой антитело против B7-H4 и гликан, подлежащий укорочению, представляет собой диантеннарную структуру комплексного типа и не присутствует в консервативном участке N-гликозилирования IgG на N297, эндогликозидаза представляет собой Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию.

**[622]** В некоторых вариантах осуществления, когда гликан, подлежащий укорочению, имеет высокое содержание маннозы, эндогликозидаза представляет собой Endo H, Endo M, Endo A, Endo F1 или их комбинацию.

**[623]** В некоторых вариантах осуществления, когда гликопротеин представляет собой антитело против B7-H4 и олигосахарид, подлежащий укорочению, имеет высокое содержание маннозы в дополнение к наличию диантеннарной структуры комплексного типа в консервативном участке N-гликозилирования IgG на N297, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo S или Endo SH. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой Endo SH.

**[624]** В некоторых вариантах осуществления фермент эндогликозидаза, как определено в настоящем описании, содержит последовательность, кодирующую метку, для простоты очистки. В некоторых вариантах осуществления указанная метка включает, но не ограничивается ими, FLAG-метку, поли(His)-метку, HA-метку, Мус-метку, SUMO-метку, GST-метку, MBP-метку или CBP-метку. В некоторых вариантах осуществления указанная метка представляет собой 6xHis-метку. В некоторых вариантах осуществления указанная

метка ковалентно связана с ферментом эндогликозидазой на С-конце фермента или на внутреннем остатке. В некоторых вариантах осуществления указанная метка ковалентно связана с ферментом эндогликозидазой на N-конце фермента.

**[625]** В некоторых вариантах осуществления Endo SH представляет собой слитую конструкцию между двумя эндогликозидазами, Endo S и Endo H, связанными Gly-богатым спейсером, содержащим внутреннюю 6xHis-метку, с общей молекулярной массой 139 кДа.

#### Гликозилтрансфераза

**[626]** Процесс получения модифицированного антитела против B7-H4 включает обработку дегликозилированного/укороченного антитела, имеющего необязательно фукозилированную часть концевой N-ацетилглюкозамина (GalNAc), соединением формулы S''(A'')-P'' в присутствии гликозилтрансферазы с получением модифицированного антитела против B7-H4, имеющего заместитель GlcNAc-S''(A''), соединенный с антителом на C1 части GalNAc через  $\beta$ -1,4-О-гликозидную связь.

**[627]** В некоторых вариантах осуществления гликозилтрансферазы представляют собой  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазу (4Gal-T),  $\beta$ -(1,4)-ацетилгалактозаминилтрансферазу ( $\beta$ -(1,4)-GalNAcT или GalNAcT) или их мутант.

**[628]**  $\beta$ -(1,4)-ацетилгалактозаминилтрансферазы ( $\beta$ -(1,4)-GalNAcT или GalNAcT) идентифицированы в ряде организмов, включая людей, *Caenorhabditis elegans* (Kawar et al, J. Biol. Chem. 2002, 277, 34924, включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), *Drosophila melanogaster* (Hoskins et al. Science 2007, 316, 1625, включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) и *Trichoplusia ni* (Vadaie et al, J. Biol. Chem. 2004, 279, 33501, включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

**[629]**  $\beta$ -(1,4)-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы ( $\beta$ -(1,4)-GalNAcT) известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT представляет собой фермент, который катализирует перенос N-ацетилгалактозамина (GalNAc) с уридиндифосфат-GalNAc (UDP-GalNAc, также упоминаемого как GalNAc-UDP) на часть концевой GlcNAc гликана гликопротеина, где C1 части GalNAc соединен с антителом через  $\beta$ -1,4-О-гликозидную связь. В некоторых вариантах осуществления часть концевой GlcNAc является фукозилированной.

**[630]** В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, используемый в способе по изобретению, представляет собой или происходит из фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT беспозвоночных, как например, представляет собой или происходит из  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, которая происходит из вида беспозвоночных животных. Фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT может представлять собой или может происходить из любого фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT беспозвоночных, известного специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT представляет собой или происходит из фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, который происходит из типа Nematoda, например, класса *Chromadorea* или *Secernentea*, или типа *Arthropoda*, например, класса *Insecta*. В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT представляет собой или происходит из



фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, который происходит из *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis remanei*, *Caenorhabditis briggsae*, *Ascaris suum*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*, *Cerapachys biroi*, *Zootermopsis nevadensis*, *Camponotus floridanus*, *Crassostrea gigas* или *Danaus plexippus*, (например, из *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum*, *Trichoplusia ni* или *Drosophila melanogaster*). В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT представляет собой или происходит из фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, который происходит из *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum* или *Trichoplusia ni*. В других вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT представляет собой или происходит из фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, который происходит из *Trichoplusia ni*.

**[631]** Термин "происходит из" включает, например, укороченные ферменты, мутантные ферменты, ферменты, содержащие метку для простоты очистки, или комбинацию этих модификаций. Таким образом, "происходящий" относится к наличию аминокислотной последовательности, которая изменена относительно встречающегося в природе фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT посредством замены, инсерции, делеции или добавления одной или нескольких (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более) аминокислот, соответственно. Фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, который происходит из фермента  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, в настоящем описании также упоминается как дериватизированный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, или модифицированный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, или мутантный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT.

**[632]** В некоторых вариантах осуществления дериватизированный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT модифицирован посредством добавления дополнительных N- или C-концевых аминокислот или химических частей или посредством делеции N- или C-концевых аминокислот для повышения стабильности, растворимости, активности и/или простоты очистки.

**[633]** В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT модифицирован посредством делеции N-концевого цитоплазматического домена и трансмембранного домена и упоминается как укороченный фермент.

**[634]** Фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, где одна или несколько аминокислот заменены, добавлены или делетированы, в настоящем описании упоминается как мутантный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT или дериватизированный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT. В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT модифицирован путем делеции N-концевого цитоплазматического домена и трансмембранного домена, и подвергнут мутации путем замены одной или нескольких аминокислот. Замена одной или нескольких аминокислот в настоящем описании также упоминается как мутация. Фермент, содержащий одну или несколько замененных аминокислот, также упоминается как мутантный фермент.

**[635]** В некоторых вариантах осуществления, когда гликозилтрансфераза представляет собой фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT или укороченный фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, фермент дополнительно содержит одну или несколько мутаций. В некоторых вариантах

осуществления этим мутации включают, но не ограничиваются ими, замену изолейцина (Ile, также обозначаемый как I) в положении 257 на лейцин (Leu, также обозначаемый как L), метионин (Met, также обозначаемый как M) или аланин (Ala, также обозначаемый как A). В некоторых вариантах осуществления также предусматривается замена метионина (Met, также обозначаемый как M) в положении 312 на гистидин (His, также обозначаемый как H). Следует отметить, что нумерация положений аминокислот в настоящем описании основана на нумерации положений аминокислот в ферменте  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT дикого типа. Когда фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT представляет собой, например, укороченный фермент, число, используемое в настоящем описании для указания на положение аминокислотной замены, соответствует нумерации положений аминокислот в соответствующем ферменте  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT дикого типа.

**[636]** В некоторых вариантах осуществления гликозилтрансфераза представляет собой фермент  $\beta$ (1,4)-GalT, содержащий мутантный каталитический домен.

**[637]** Каталитический домен может иметь аминокислотную последовательность, присутствующую в ферменте дикого типа, или иметь аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности дикого типа. Каталитический домен, имеющий аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности дикого типа, упоминается в настоящем описании как мутантный каталитический домен. В некоторых вариантах осуществления мутация может включать одно изменение аминокислоты (например, точковую мутацию) или множество изменений аминокислот (например, от 1 до 10, или от 1 до 6, или 1, 2, 3 или 4, или 1 или 2 аминокислоты), или делецию или инсерцию одной или нескольких аминокислот (например, от 1 до 10, или от 1 до 6, или 1, 2, 3 или 4, или 1 или 2 аминокислоты). В некоторых вариантах осуществления указанный мутантный каталитический домен может присутствовать в полноразмерном ферменте, например,  $\beta$ (1,4)-галактозилтрансферазе или  $\alpha$ (1,3)-N-галактозилтрансферазе, а также в полипептидном фрагменте или рекомбинантном полипептиде, содержащем указанный мутантный каталитический домен, необязательно соединенный с дополнительными аминокислотами.

**[638]**  $\beta$ (1,4)-галактозилтрансфераза I в настоящем описании упоминается как GalT. Такие мутантные каталитические домены GalT описаны, например, в WO 2004/063344, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В WO 2004/063344 также описаны мутанты Tyr-289 GalT и способы их получения. Эти мутанты обозначаются как Y289L, Y289N или Y289I.

**[639]** В некоторых вариантах осуществления мутантный каталитический домен GalT представляет собой Y289L, Y289N, Y289I, Y284L или R228K. В некоторых вариантах осуществления мутантный каталитический домен GalT представляет собой Y289L.

**[640]** В некоторых вариантах осуществления мутанты GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I, GalT Y289A, GalT Y289N и GalT Y289L могут быть получены способами сайт-направленного мутагенеза, описанными, например, в WO2004063344, Qasba et al, Prot. Expr. Pur. 2003, 30, 219, и Qasba et al, J. Biol. Chem. 2002,

277, 20833 (все из них включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме). В GalT Y289F аминокислота тирозин (Y) в положении 289 заменена на аминокислоту фенилаланин (F), в GalT Y289M указанный тирозин заменен на аминокислоту метионин (M), в GalT Y289V заменен на аминокислоту валин (V), в GalT Y289G заменен на аминокислоту глицин (G), в GalT Y289I заменен на аминокислоту изолейцин (I) и в Y289A на аминокислоту аланин (A).

**[641]** В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT содержит последовательность, кодирующую метку для простоты очистки. В некоторых вариантах осуществления указанная метка включает, но не ограничивается ими, FLAG-метку, поли(His)-метку, HA-метку, Мус-метку, SUMO-метку, GST-метку, MBP-метку или СБР-метку. В других вариантах осуществления указанная метка представляет собой 6хHis-метку. В некоторых вариантах осуществления указанная метка ковалентно присоединена к ферменту  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT на С-конце фермента. В некоторых вариантах осуществления указанная метка ковалентно присоединена к ферменту  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT на N-конце фермента.

**[642]** В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT содержит N-концевую 6хHis-метку и имеет общую молекулярную массу 45,7 кДа. В некоторых вариантах осуществления фермент  $\beta$ -(1,4)-GalNAcT, содержащий N-концевую 6хHis-метку, происходит из *Trichopulsia ni*.

Молекулы P"-S"-A"

**[643]** В некоторых вариантах осуществления молекула P"-S"-A" для применения в процессе получения модифицированного антитела против В7-Н4 по настоящему изобретению может представлять собой любое производное нуклеотида с сахаром, которое является субстратом для подходящего катализатора-галактозилтрансферазы.

**[644]** В некоторых вариантах осуществления S"-A" представляет собой часть сахарного производного, где:

**[645]** S" представляет собой сахар или дериватизированный сахар; и A" представляет собой функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой части линкер-лекарственное средство.

**[646]** В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой азидо, кето или алкинильную часть. В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой часть азидо или кето. В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой часть азидо. В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой -N<sup>3</sup>. В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой часть кето.

**[647]** В некоторых вариантах осуществления A" представляет собой - [C(R<sup>8k</sup>)<sub>2</sub>]<sub>x2</sub>C(O)R<sup>9k</sup>, где:

R<sup>9k</sup> представляет собой метил или необязательно замещенный C<sub>2-24</sub> алкил;

каждый R<sup>8k</sup> независимо представляет собой водород, галоген или R<sup>9k</sup>; и

x<sub>2</sub> представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 24.

**[648]** В некоторых вариантах осуществления x<sub>2</sub> представляет собой целое число в

диапазоне от 0 до 10. В некоторых вариантах осуществления  $x_2$  равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

**[649]** В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{8k}$  представляет собой водород.

**[650]** В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой алкинильную часть. В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой концевую алкинильную, циклоалкинильную или гетероциклоалкинильную часть. В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой концевую алкинильную часть. В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой циклоалкинильную часть. В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой гетероциклоалкинильную часть.

**[651]** В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой группу  $-[C(R^{8k})_2]_{x_2}-C\equiv C-R^{8k}$ , где  $R^{8k}$  и  $x_2$  являются такими, как определено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления  $A''$  представляет собой  $-[CH_2]_{x_2}-C\equiv CH$ .

**[652]** В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из сахара или дериватизированного сахара, например, аминсахара или иным образом дериватизированного сахара. В некоторых вариантах осуществления примеры сахаров и дериватизированных сахаров включают, но не ограничиваются ими, галактозу (Gal), маннозу (Man), глюкозу (Glc), глюкуроновую кислоту (Gcu) и фукозу (Fuc). Понятно, что аминсахар представляет собой сахар, где гидроксильная (OH) группа заменена группой амина. Примеры аминсахаров включают, но не ограничиваются ими, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Примеры иным образом дериватизированных сахаров включают, но не ограничиваются ими, глюкуроновую кислоту (Gcu) и N-ацетилнейраминовою кислоту (сиаловая кислота).

**[653]** В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из галактозы (Gal), маннозы (Man), N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), глюкозы (Glc), N-ацетилгалактозамина (GalNAc), глюкуроновой кислоты (Gcu), фукозы (Fuc) или N-ацетилнейраминовою кислоты (сиаловая кислота). В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из GlcNAc, Glc, Gal или GalNAc. В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из Glc. В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из Gal или GalNAc. В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из Gal. В некоторых вариантах осуществления  $S''-A''$  происходит из GalNAc.

**[654]** В некоторых вариантах осуществления функциональная группа  $A''$  может быть присоединена к  $S''$  различными путями.

**[655]** В некоторых вариантах осуществления  $A''$  прямо присоединен к атому углерода в положении C2, C3, C4 или C6 сахара или дериватизированного сахара  $S''$  (например, вместо гидроксила в соответствующем положении).

**[656]** В некоторых вариантах осуществления  $S''$  представляет собой фукозу или дериватизированную фукозу, которая лишена какого-либо гидроксила в положении C6. В некоторых вариантах осуществления, когда  $A''$  присоединен к положению C6 фукозы или

дериватизированной фукозы, А" прямо присоединен к атому углерода в положении С6.

**[657]** В некоторых вариантах осуществления А" представляет собой часть азидо, и А" присоединен в положении С2, С4 или С6 сахара или дериватизированного сахара S".

**[658]** В некоторых вариантах осуществления А" представляет собой часть азидо, и А" прямо присоединен к атому углерода в положении С2, С3, С4 или С6 сахара или дериватизированного сахара S" (например, вместо гидроксила в соответствующем положении). В некоторых вариантах осуществления S"-А" представляет собой 6-азидофукозу (6-AzFuc). В некоторых вариантах осуществления А" представляет собой часть азидо, и А" присоединен к N-ацетильной части аминосахара или дериватизированного аминосахара (например, путем замены ацетильной части на азидоацетильную часть). В некоторых вариантах осуществления S"-А" представляет собой 2-азидоацетамидогалактозу (GalNAz), 6-азидо-6-дезоксигалактозу (6-AzGal), 6-азидо-6-дезоксид-2-ацетамидогалактозу (6-AzGalNAc), 4-азидо-4-дезоксид-2-ацетамидогалактозу (4-AzGalNAc), 6-азидо-6-дезоксид-2-азидоацетамидогалактозу (6-AzGalNAz), 2-азидоацетамидоглюкозу (GlcNAz), 6-азидо-6-дезоксиглюкозу (6-AzGlc), 6-азидо-6-дезоксид-2-ацетамидоглюкозу (6-AzGlcNAc), 4-азидо-4-дезоксид-2-ацетамидоглюкозу (4-AzGlcNAc) или 6-азидо-6-дезоксид-2-азидоацетамидоглюкозу (6-AzGlcNAz). В некоторых вариантах осуществления S"-А" представляет собой GalNAz, 4-AzGalNAc, GlcNAz или 6-AzGlcNAc.

**[659]** В некоторых вариантах осуществления Р"-S"-А" представляет собой соединение формулы (XXIVb), (XXXIVc) или (XXIVd), или его соль.

**[660]** В некоторых вариантах осуществления А" представляет собой кето, и А'' прямо присоединен к атому углерода в положении С2 сахара или дериватизированного сахара S" (например, вместо гидроксила в соответствующем положении).

**[661]** В некоторых вариантах осуществления А" присоединен к атому азота аминосахара или дериватизированного аминосахара, например, С2-дериватизированного аминосахара. В некоторых вариантах осуществления дериватизированный аминосахар содержит часть -NC(O)-R<sup>9k</sup>, где R<sup>9k</sup> представляет собой метил или необязательно замещенный С<sub>2-24</sub> алкил (например, этил).

**[662]** В некоторых вариантах осуществления R<sup>9k</sup> представляет собой этил.

**[663]** В некоторых вариантах осуществления S"-А" представляет собой 2-дезоксид-(2-оксопропил)галактозу (2-кето-Gal), 2-N-пропионилгалактозамин (2-N-пропионил-GalNAc), 2-N-(4-оксопентаноил)галактозамин (2-N-Lev-Gal) или 2-N-бутирилгалактозамин (2-N-бутирил-GalNAc). В некоторых вариантах осуществления S"-А" представляет собой 2-кето-GalNAc или 2-N-пропионил-GalNAc.

**[664]** В некоторых вариантах осуществления Р"-S"-А" представляет собой соединение формулы (XXIVe) или (XXIVf), или его соль.

**[665]** В некоторых вариантах осуществления А" представляет собой концевой алкинил, циклоалкинил или гетероциклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления А" присоединен к С2-дериватизированному аминосахару S".

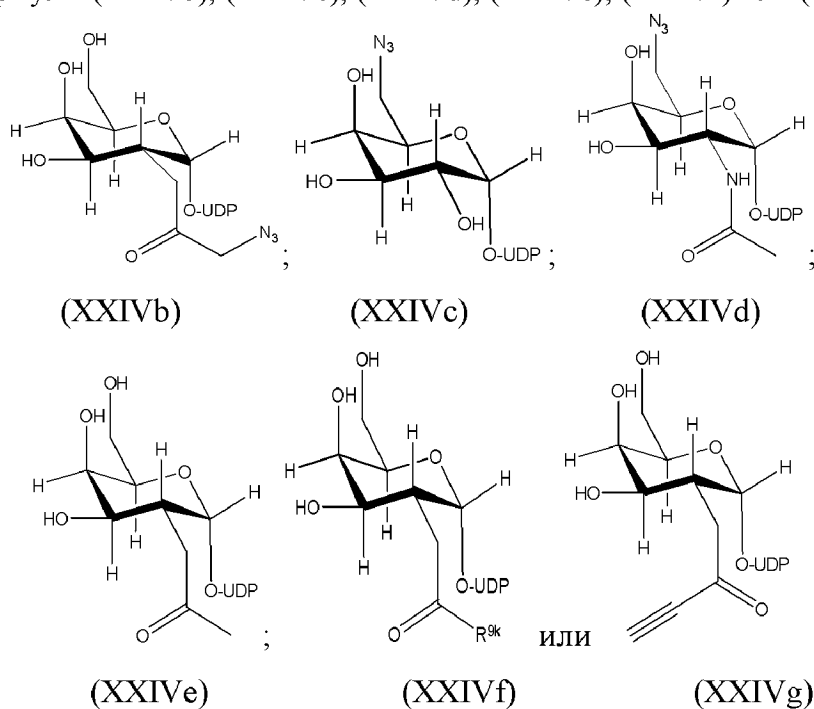
[666] В некоторых вариантах осуществления S"-A" представляет собой 2-(бут-3-иновая кислота амидо)-2-дезоксигалактозу.

[667] В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой соединение формулы (XXIVg) или его соль. В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой соединение формулы (XXIVd) или его соль.

[668] В некоторых вариантах осуществления соединения P"-S"-A" могут быть синтезированы разными способами, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления соединения синтезируют путем присоединения нуклеозидмонофосфата или нуклеозиддифосфата P" к сахарному производному S"—A", например, как описано в Wang *et al.* (*Chem. Eur. J.* **16**:13343-13345 (2010)), Piller *et al.* (*ACS Chem. Biol.* **7**:753 (2012)), Piller *et al.* (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**:5459-5462 (2005)) и публикации заявки РСТ № WO/2009/102820, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[669] В некоторых вариантах осуществления P" представляет собой нуклеозидмоно- или дифосфат. В некоторых вариантах осуществления P" представляет собой уридиндифосфат (UDP), гуанозиндифосфат (GDP), тимидиндифосфат (TDP), цитидиндифосфат (CDP) или цитидинмонофосфат (CMP). В некоторых вариантах осуществления P" представляет собой уридиндифосфат (UDP).

[670] В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой соединение формулы (XXIVb), (XXIVc), (XXIVd), (XXIVe), (XXIVf) или (XXIVg):



или их соль, где: R<sup>9k</sup> представляет собой C<sub>2-24</sub> алкильную группу.

[671] В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой GalNAz-UDP (например, формулы (XXIVb)), 6-AzGal-UDP (например, формулы (XXIVc)), 6-AzGalNAc-UDP (например, формулы (XXIVd)), 4-AzGalNAz-UDP, 6-AzGalNAz-UDP, 6-

AzGlc-UDP, 6-AzGlcNAz-UDP, 2-кето-Gal-UDP (например, формулы (XXIVe)), 2-N-пропионил-GalNAc-UDP (например, формулы (XXIVf), где R<sup>9k</sup> представляет собой этил) или 2-(бут-3-иновая кислота амидо)-2-дезоксигалактоза-UDP (например, формулы (XXIVg)).

[672] В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой GalNAz-UDP или 4-AzGalNAc-UDP. В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой соединение формулы (XXIVb) или (XXIVd). Синтез GalNAz-UDP (например, формулы (XXIVb)) и 6-AzGalNAc-UDP (например, формулы (XXIVd)) описан в Piller *et al.* (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**:5459-5462 (2005)) и Wang *et al.* (*Chem. Eur. J.* **16**:13343-13345 (2010)), все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[673] В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой 4-AzGalNAc-UDP. В некоторых вариантах осуществления P"-S"-A" представляет собой соединение формулы (XXIVd) или его соль. Синтез 2-кето-Gal-UDP (XXIVe) описан в Qasba *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* **125**:16162 (2003)) и в его сопроводительной информации, оба из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

[674] Синтез 2-(бут-3-иновая кислота амидо)-2-дезоксигалактоза-UDP описан в публикации заявки PCT № WO/2009/102820, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### **Вариабельный d<sub>13</sub>**

[675] В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 14, от приблизительно 2 до приблизительно 12, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 2 до приблизительно 4, от приблизительно 4 до приблизительно 10, от приблизительно 4 до приблизительно 8, от приблизительно 4 до приблизительно 6, от приблизительно 6 до приблизительно 14, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 6 до приблизительно 10, от приблизительно 6 до приблизительно 8, от приблизительно 8 до приблизительно 14, от приблизительно 8 до приблизительно 12 или от приблизительно 8 до приблизительно 10.

[676] В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> представляет собой целое число в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 8.

[677] В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> равен 2, 4, 6 или 8. В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> равен 2, 6 или 8. В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> равен 8. В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> равен 6. В некоторых вариантах осуществления d<sub>13</sub> равен 2.

#### **Конъюгаты антител против B7-Н4-лекарственное средство**

[678] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты по изобретению содержат один или несколько D, где D представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства или часть лекарственного средства-агониста STING, где один или несколько D

могут быть одинаковыми или могут различаться.

**[679]** В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител против В7-Н4 или модифицированных антител против В7-Н4 присоединены к части линкер-лекарственное средство, где одно или несколько антител против В7-Н4 или модифицированных антител против В7-Н4 могут быть одинаковыми или могут различаться. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько частей линкер-лекарственное средство, которые содержат один или несколько D, соединены с одним антителом против В7-Н4 или модифицированным антителом против В7-Н4.

**[680]** В некоторых вариантах осуществления антител против В7-Н4 представляет собой антител против В7-Н4 или антител с встроенным цистеином против В7-Н4.

**[681]** В некоторых вариантах осуществления нацеливающие лиганды, линкеры и фрагменты лекарственного средства или пролекарства, описанные в настоящем описании, могут быть собраны в конъюгат или каркас по изобретению, например, в соответствии с описанными технологиями и способами. Терапевтические и нацеливающие конъюгаты по изобретению и способы их получения описаны ниже в качестве неограничивающего примера.

**[682]** В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частями линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения) составляет 10 или менее (например, 8, 6, 4 или 2).

**[683]** В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения) составляет 8 или менее.

**[684]** В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 8. В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 6. В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 5. В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 4. В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4



(или общее количество точек присоединения), составляет 3. В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 2.

**[685]** В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 8:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 6:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 4:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 составляет от приблизительно 2:1 до приблизительно 2:1.

**[686]** В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 составляет от приблизительно 6:1 до приблизительно 8:1.

**[687]** В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом В7-Н4 или антителом с встроенным цистеином против В7-Н4 составляет приблизительно 8:1.

**[688]** В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 6:1.

**[689]** В некоторых вариантах осуществления изобретение также относится к части линкер-лекарственное средство, содержащей по меньшей мере две части, где каждая часть способна к конъюгации с тиольной группой в антителе против В7-Н4 с образованием конъюгата белок-линкер-лекарственное средство.

**[690]** В некоторых вариантах осуществления одну или несколько тиольных групп антитела против В7-Н4 или антитела с встроенным цистеином против В7-Н4 получают путем восстановления белка. Затем одну или несколько тиольных групп антитела против В7-Н4 или антитела с встроенным цистеином против В7-Н4 можно подвергать реакции с одной или несколькими частями линкер-лекарственное средство, которые способны к конъюгации с тиольной группой из антитела против В7-Н4 или антитела с встроенным цистеином против В7-Н4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две части, присоединенные к антителу против В7-Н4 или антителу с встроенным цистеином против В7-Н4, представляют собой малеинимидные группы. В этих вариантах осуществления D представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства или часть лекарственного средства-агониста STING.

**[691]** В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть активированы для конъюгации с частью линкер-лекарственное средство посредством обработки восстановителем, таким как DTT (реагент Келланда, дитиотреитол) или TCEP (трис(2-

карбоксиэтил)фосфина гидрохлорид). В некоторых вариантах осуществления полноразмерные моноклональные антитела могут быть восстановлены избытком ТСЕР для восстановления дисульфидных связей (например, между остатками цистеина, присутствующими в соответствующих родительских антителах или антителе с встроенным цистеином) с образованием восстановленной формы антитела. Вновь внесенный и непарный остаток цистеина может оставаться доступным для реакции с частью линкер-лекарственное средство с образованием конъюгатов антител по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления для обеспечения конъюгации и образования конъюгата антитело-лекарственное средство добавляют избыток части линкер-лекарственное средство и смесь для конъюгации очищают для удаления избыточного промежуточного соединения линкер-лекарственное средство и других примесей.

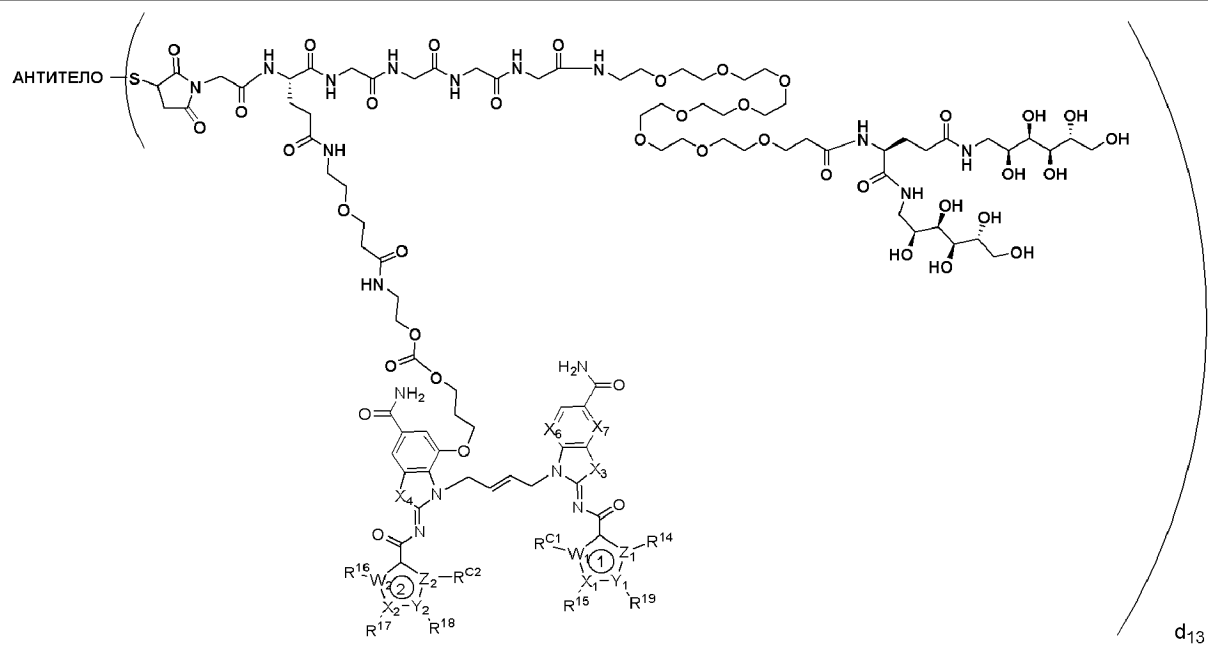
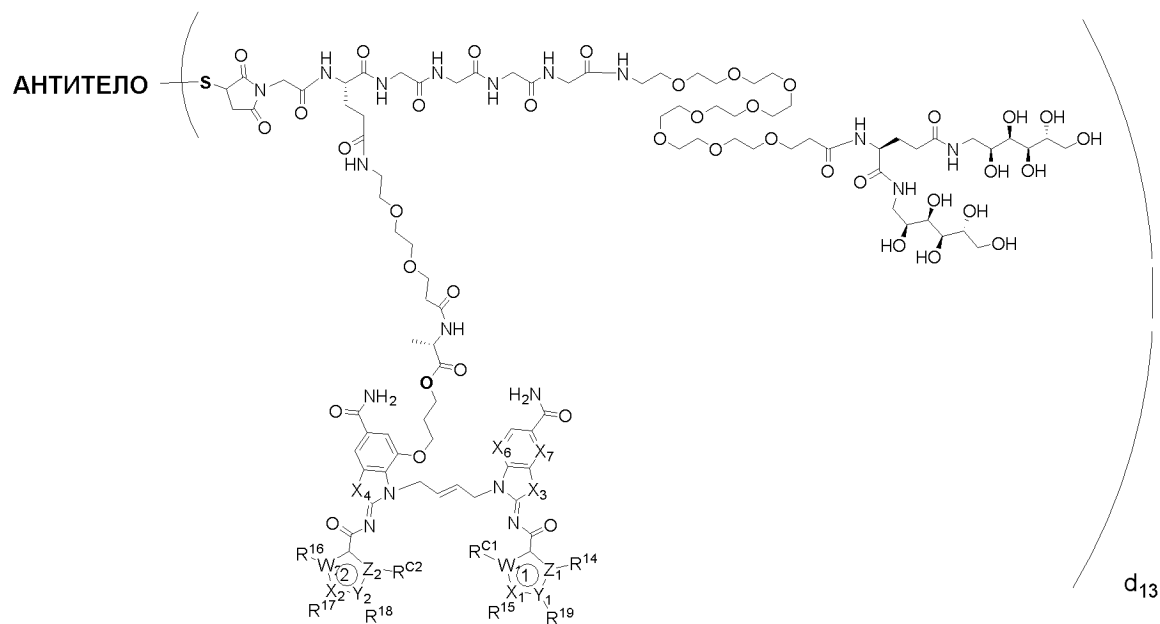
**[692]** В некоторых вариантах осуществления соотношение антитела против В7-Н4 или антитела с встроенным цистеином против В7-Н4 и части линкер-лекарственное средство составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3 или от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2.

**[693]** Конъюгаты, описанные в настоящем описании, можно очищать (т.е. удаление каких-либо исходных материалов) посредством экстенсивной диафильтрации. При необходимости можно проводить дополнительную очистку посредством эксклюзионной хроматографии для удаления каких-либо агрегированных конъюгатов. Как правило, очищенные конъюгаты содержат менее 5% (например, <2% масс./масс.) агрегированных конъюгатов при определении посредством SEC; менее 0,5% (например, <0,1% масс./масс.) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства при определении посредством ОФ-ВЭЖХ; менее 1% несущих лекарственное средство содержащих пептид каркасов при определении посредством SEC и менее 2% (например, <1% масс./масс.) неконъюгированного антитела против В7-Н4 при определении посредством НИС-ВЭЖХ.

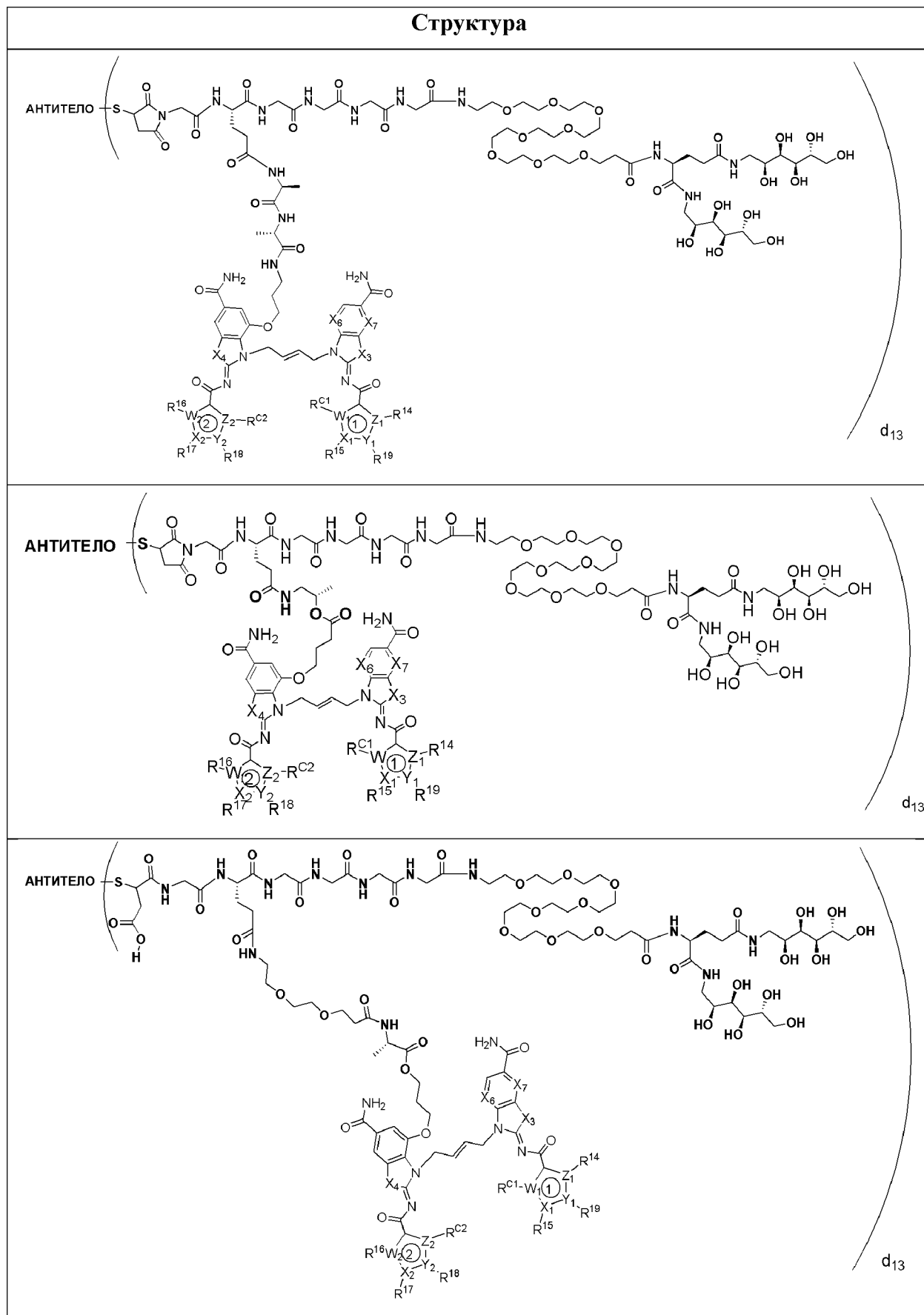
**[694]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью лекарственного средства-агониста STING, выбрано из конъюгатов, описанных в таблице А1 и таблице А2.

#### **Таблица А1**

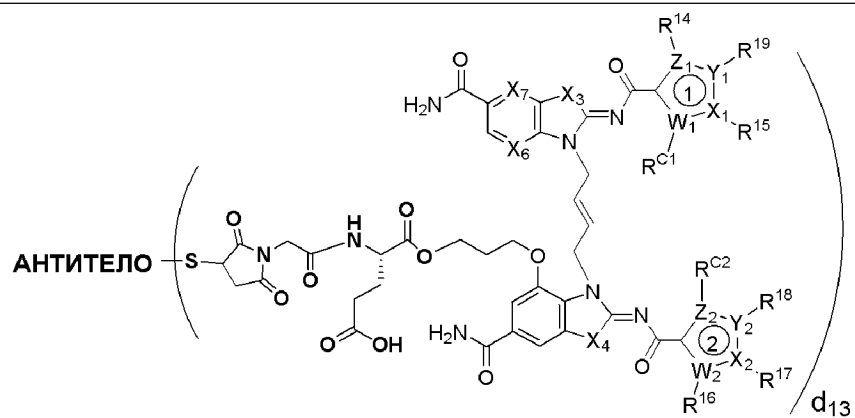
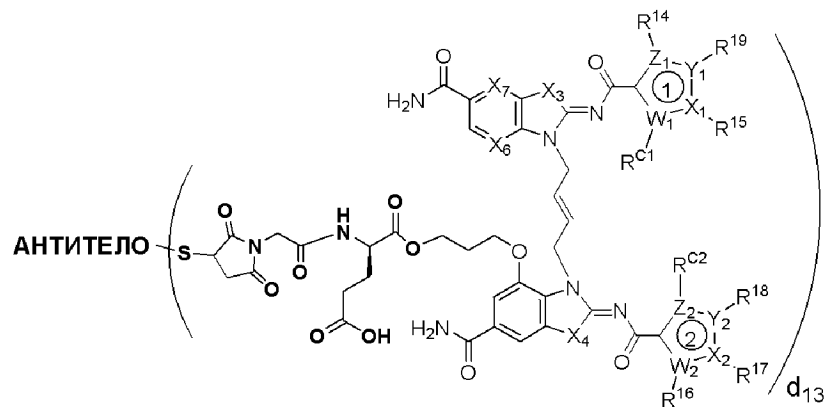
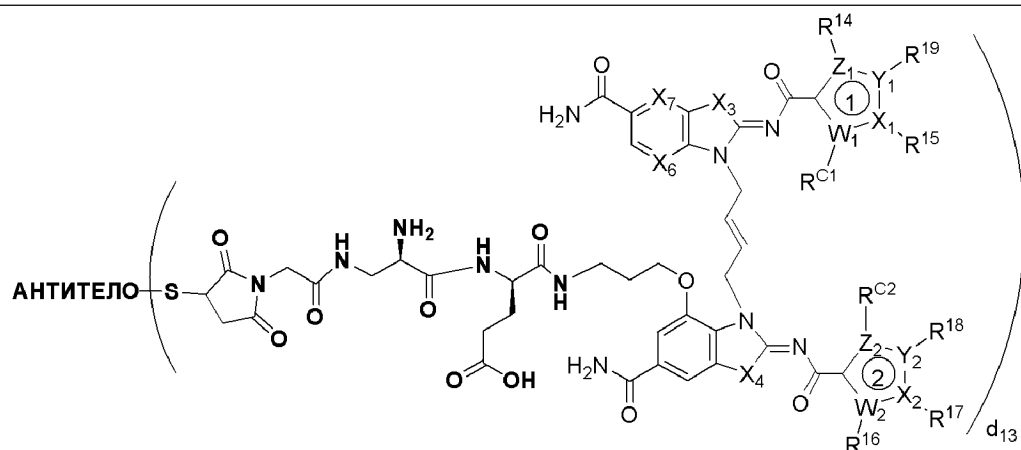
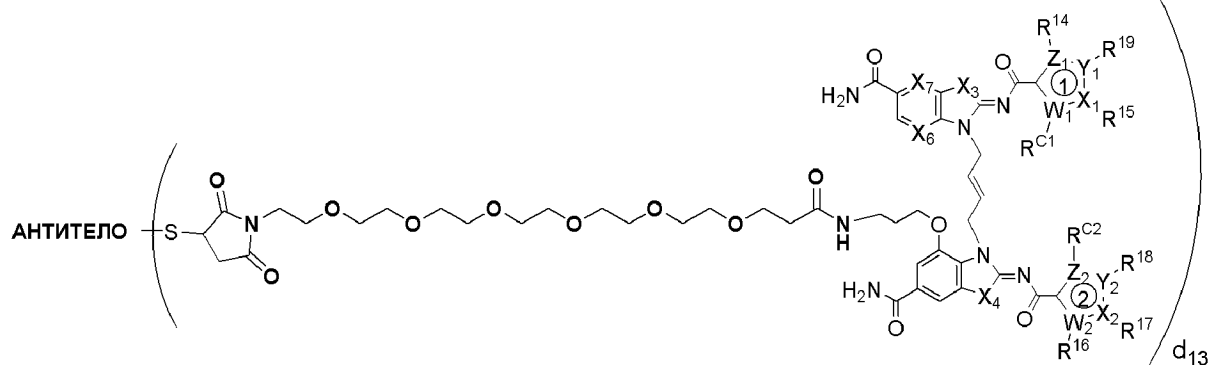
## Структура



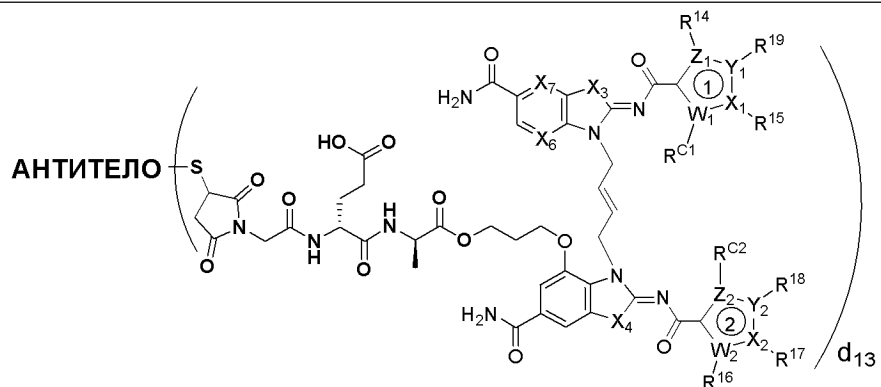
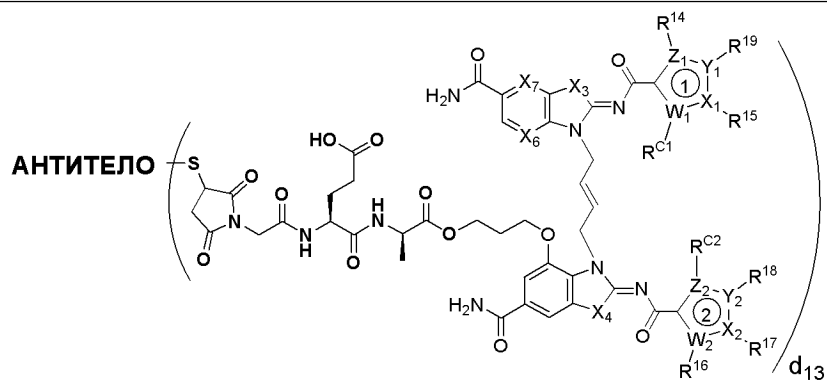
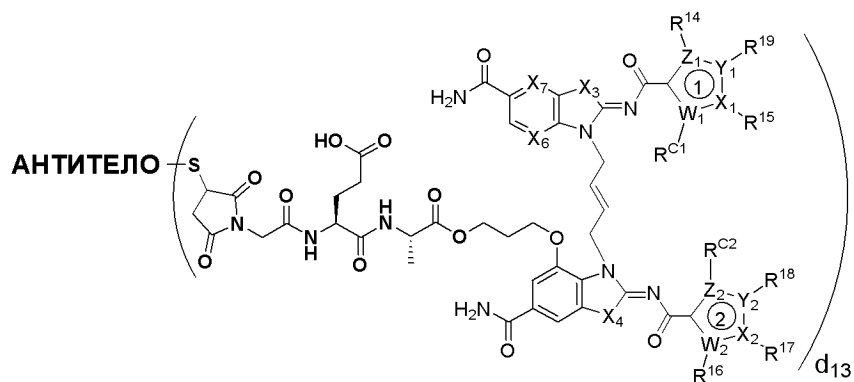
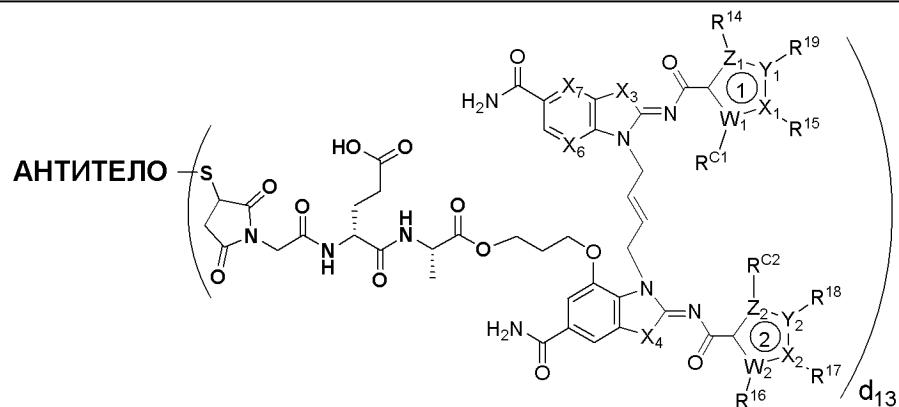
## Структура



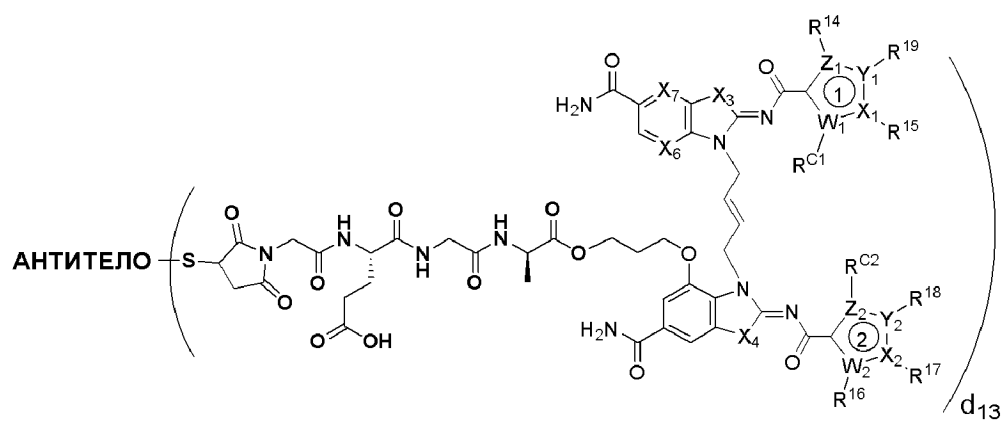
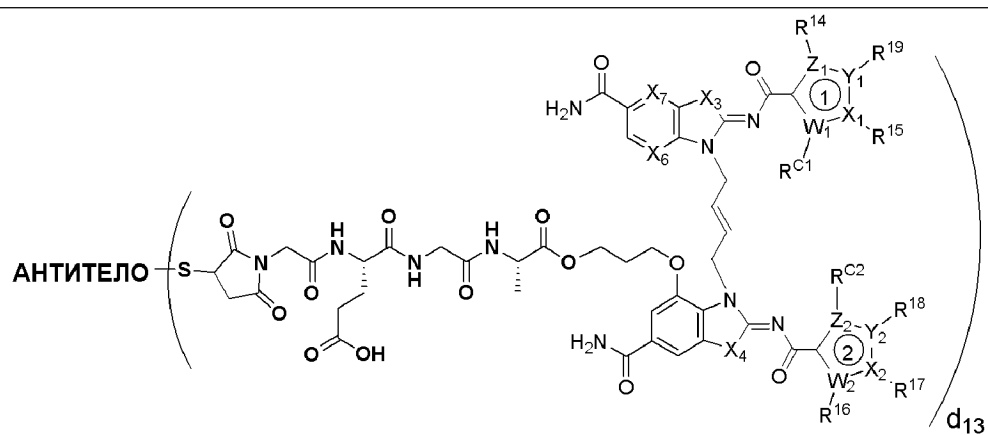
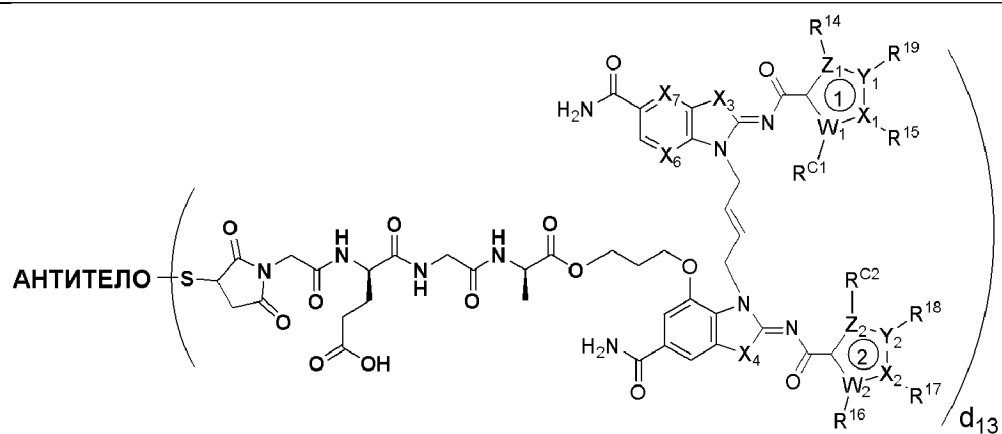
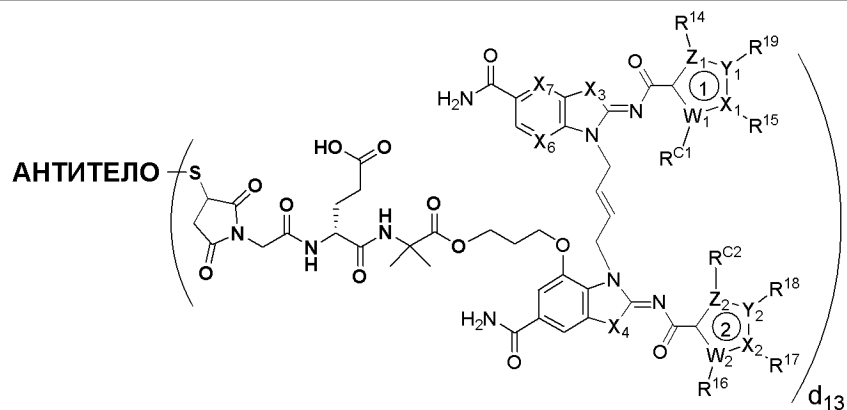
## Структура

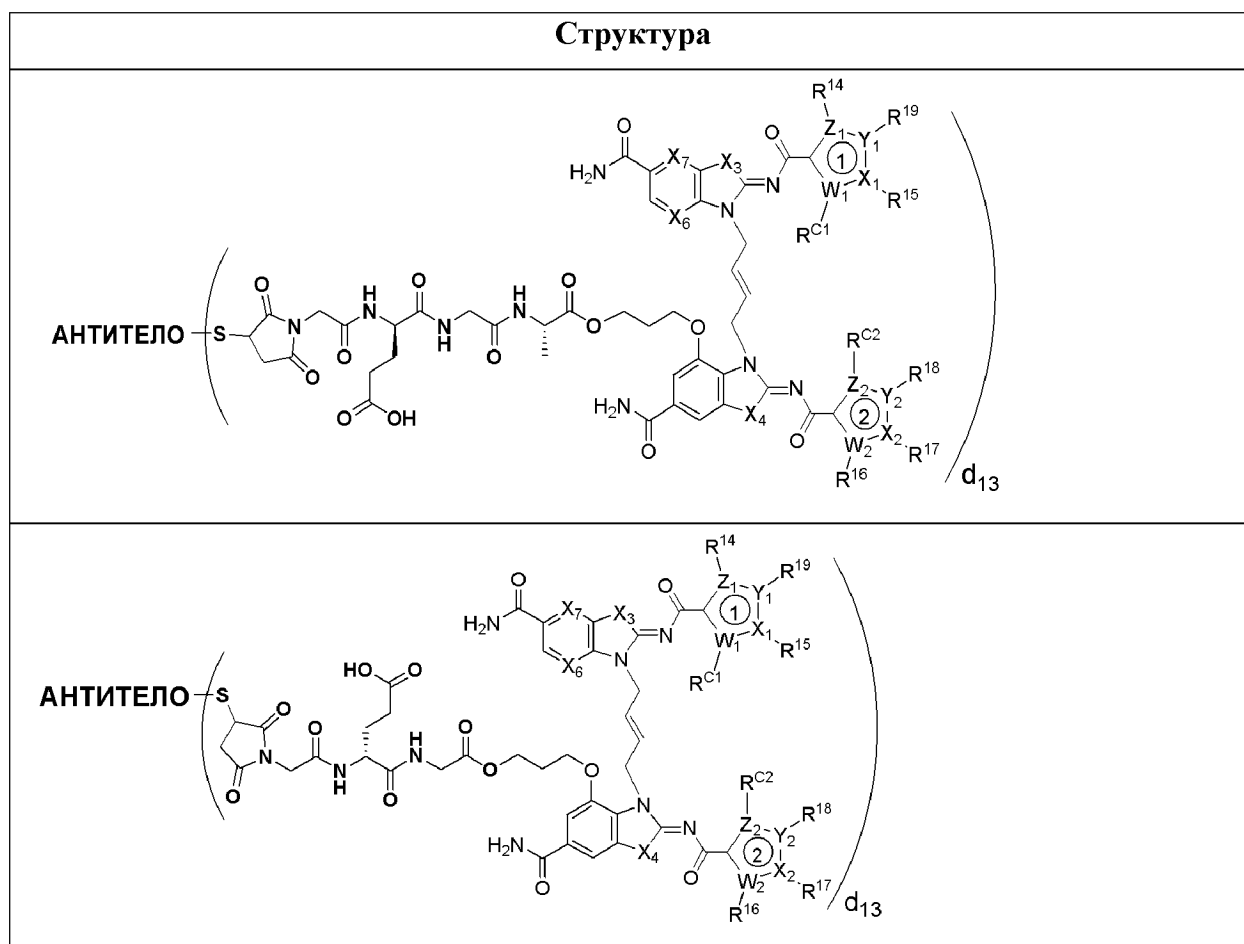


## Структура



## Структура





где  $d_{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$ ,  $R^4$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_1$ ,  $W_1$ ,  $Y_1$ ,  $Z_1$ ,  $X_2$ ,  $W_2$ ,  $Y_2$ ,  $Z_2$  являются такими, как определено в настоящем описании, и АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4.

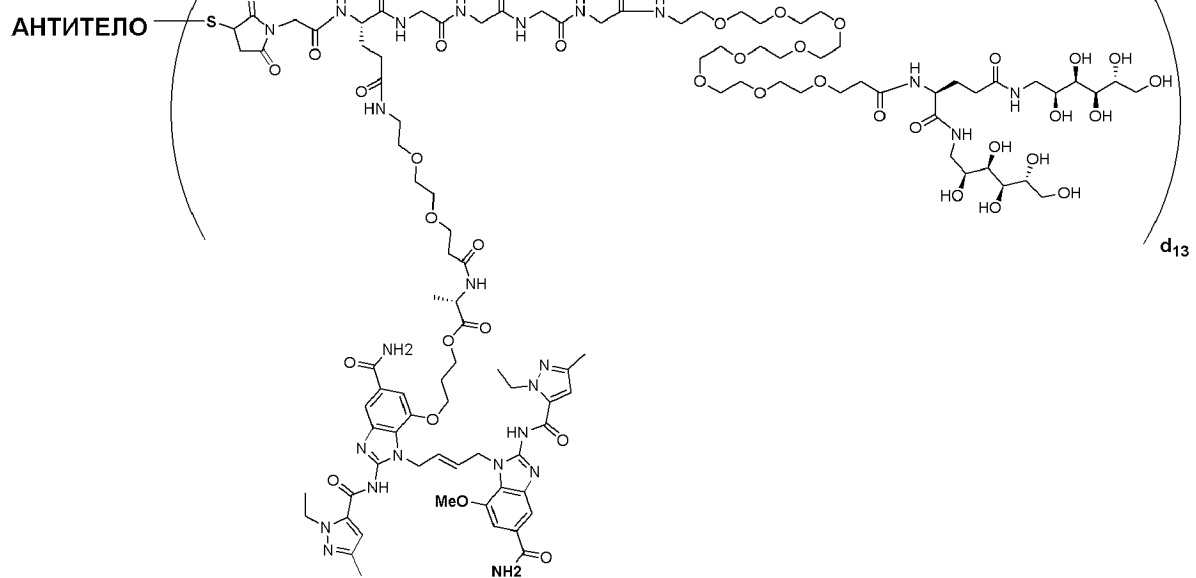
**[695]** В некоторых вариантах осуществления конъюгатов, приведенных в таблице А1,  $d_{13}$  представляет собой целое число от 6 до 8.

**[696]** В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А1,  $d_{13}$  равен 8. В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А1,  $d_{13}$  равен 7. В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А1,  $d_{13}$  равен 6.

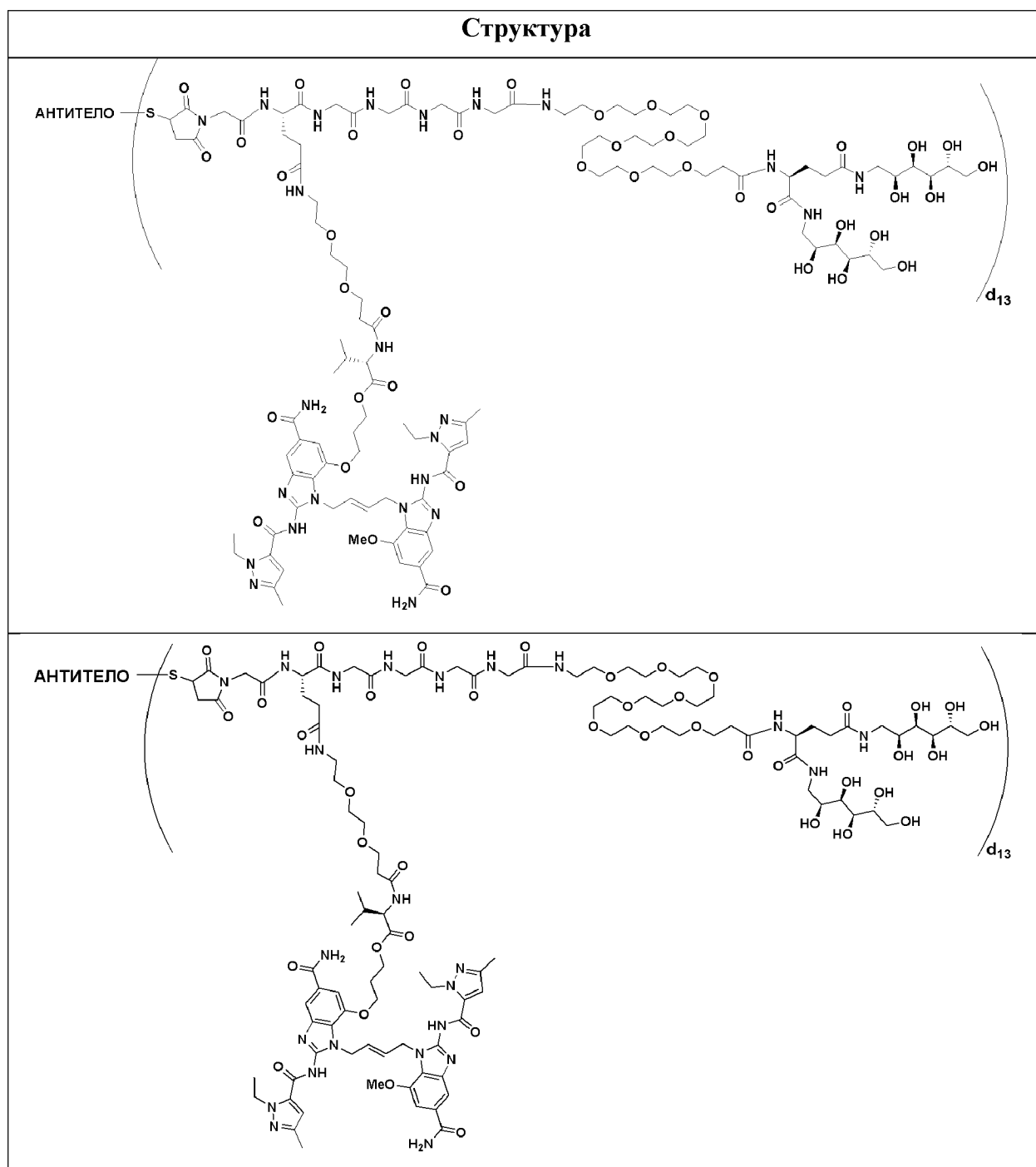
**[697]** В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А1,  $d_{13}$  равен 8.

#### Таблица А2

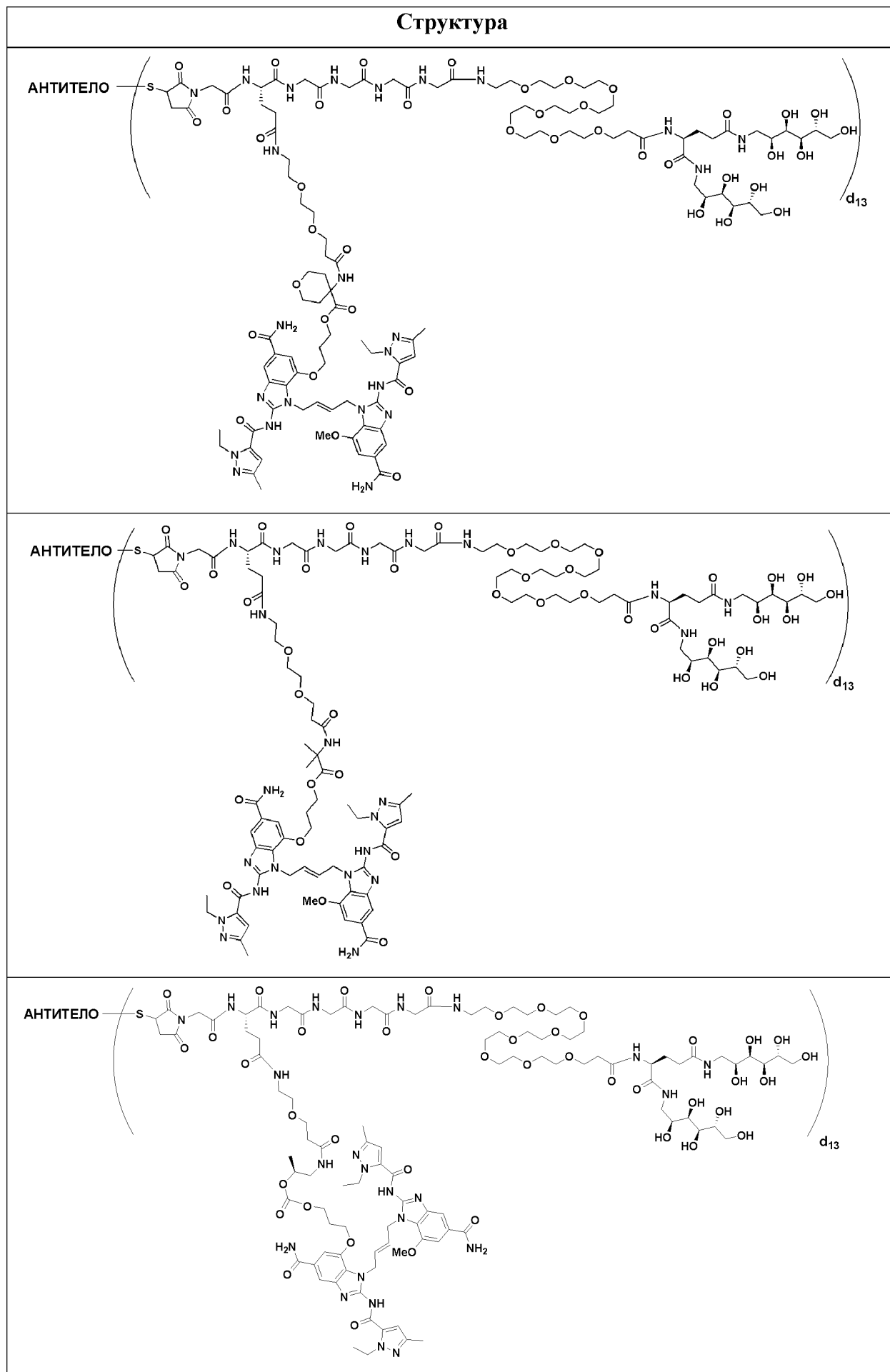




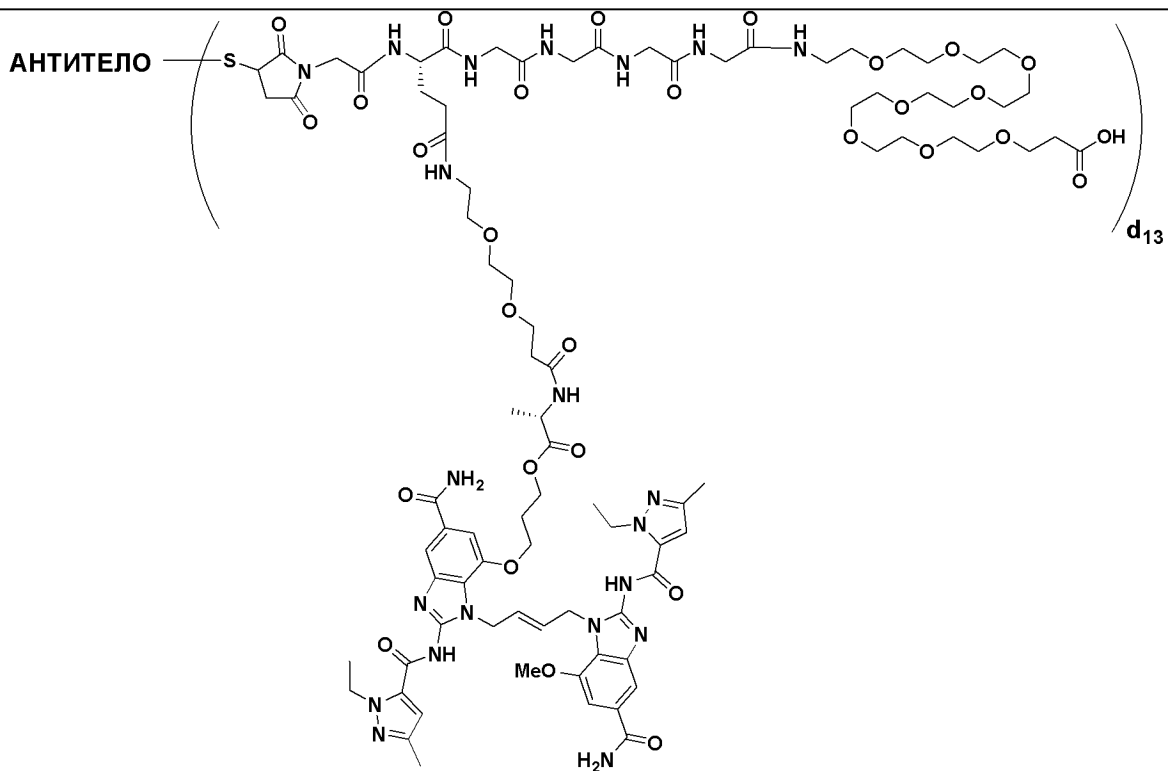
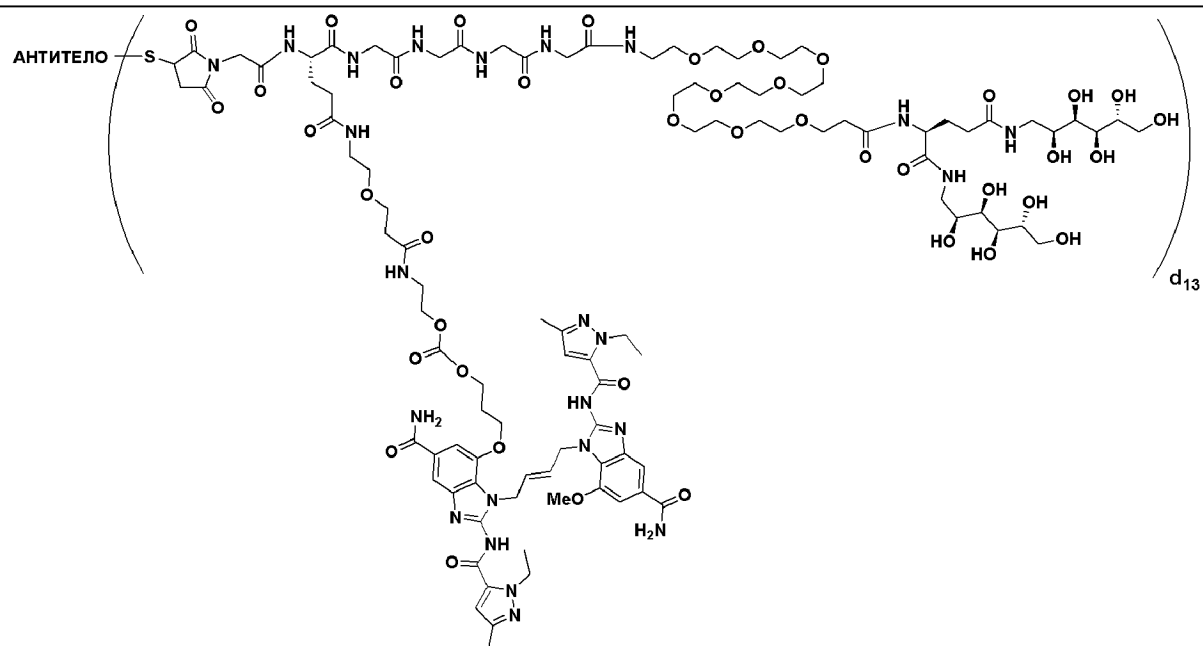
## Структура



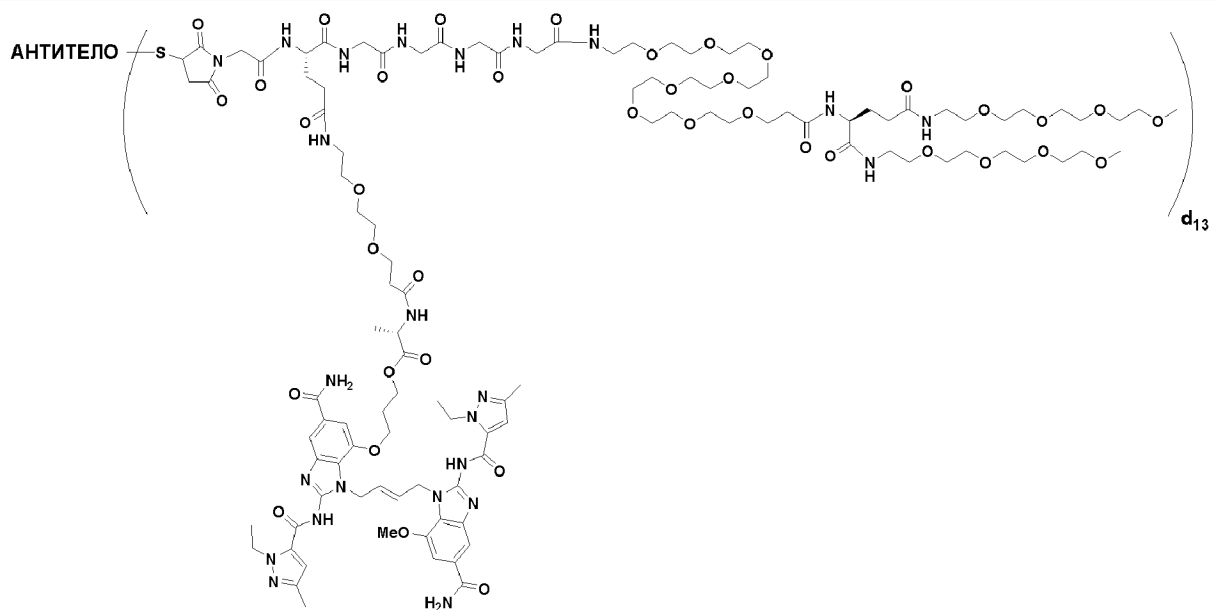
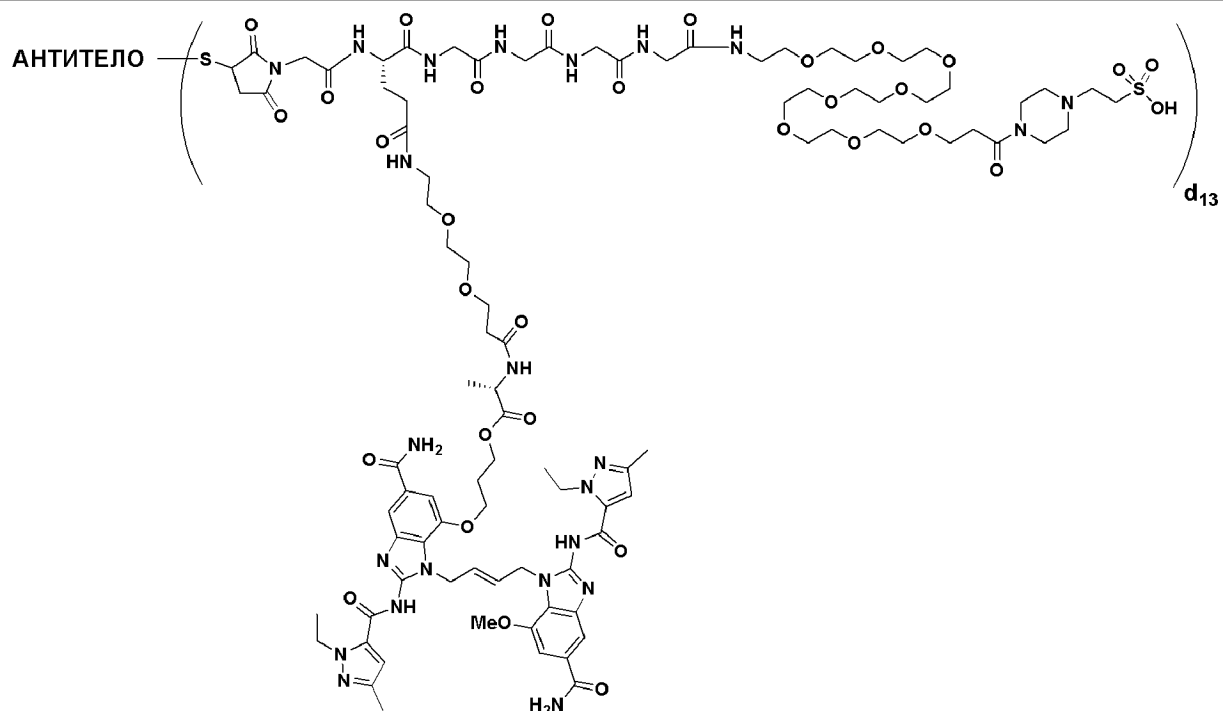
## Структура

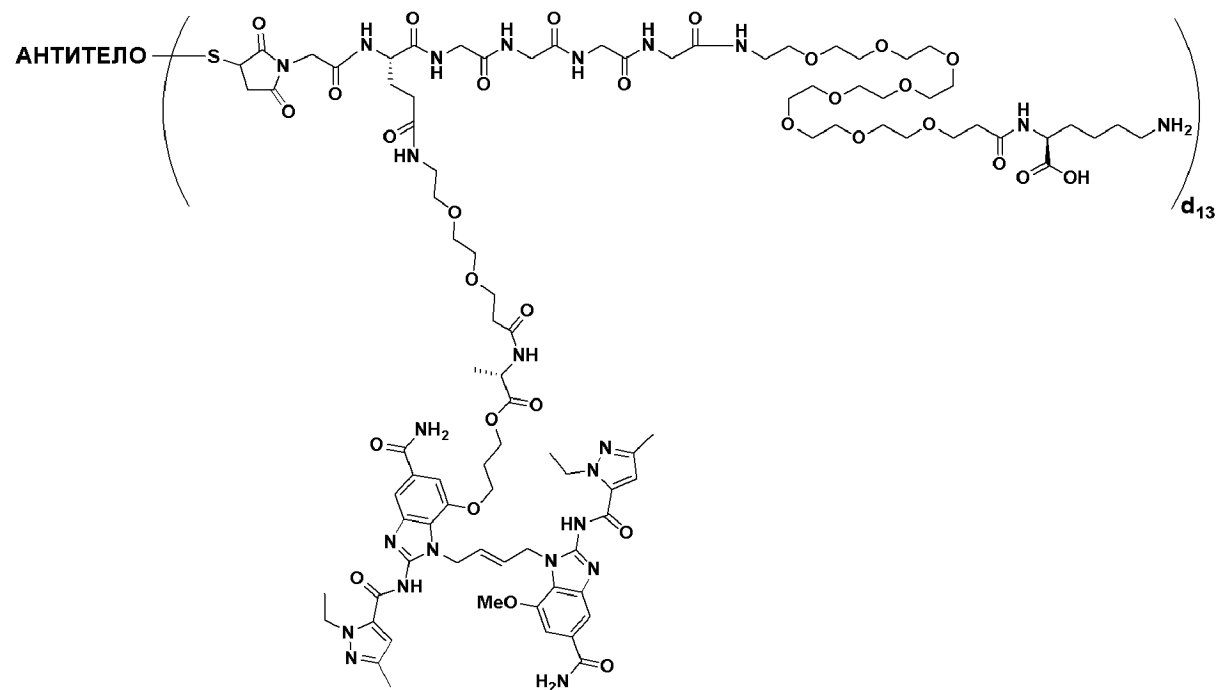


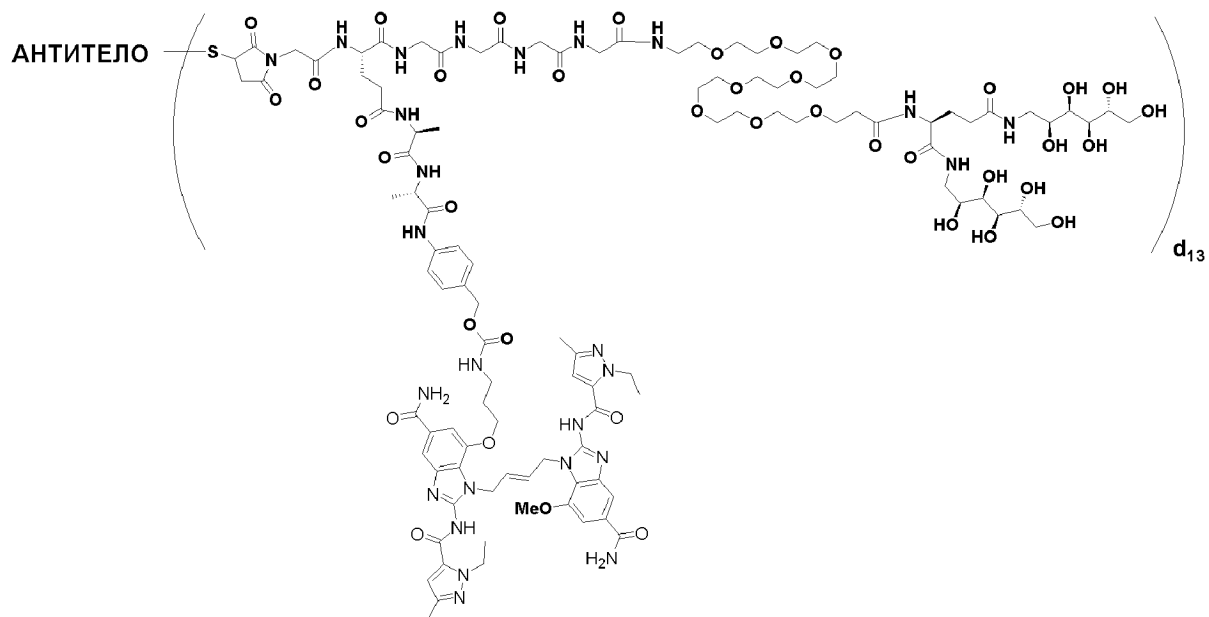
## Структура



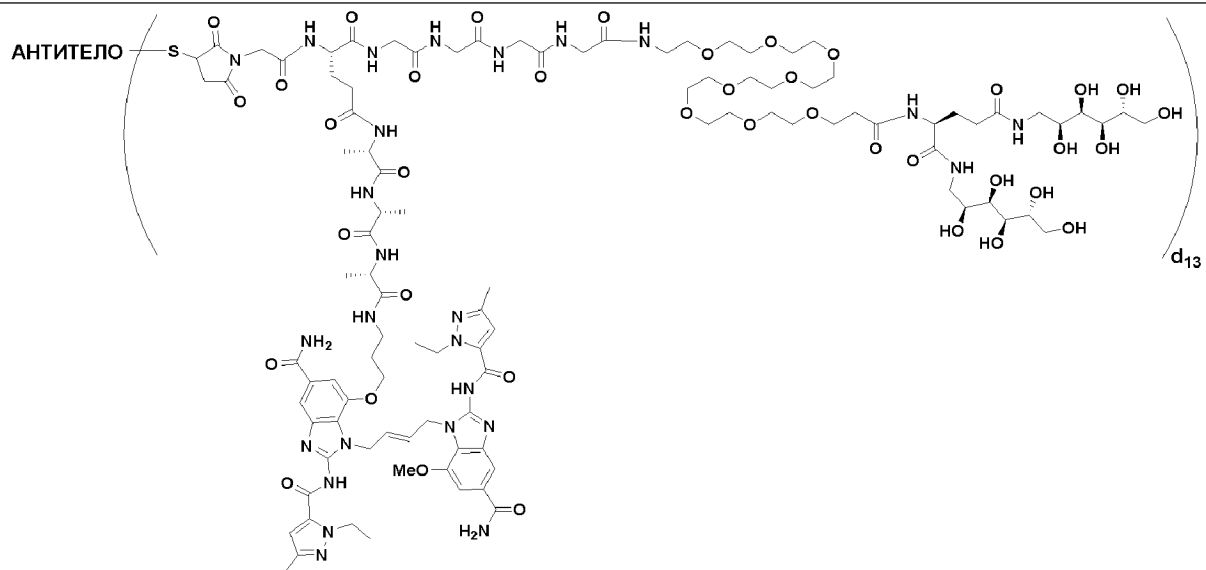
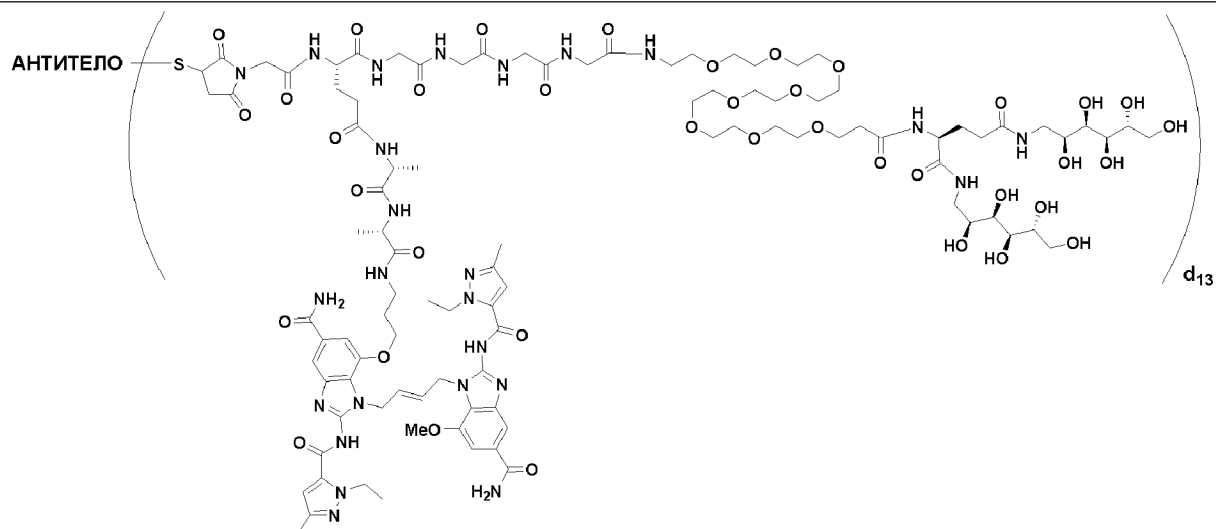
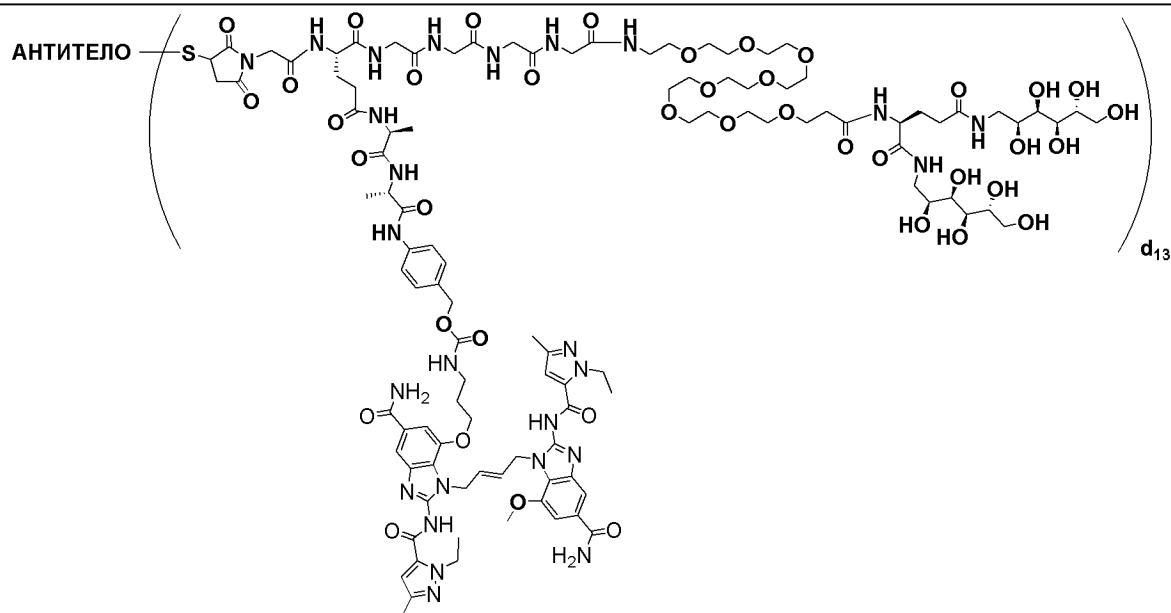
## Структура





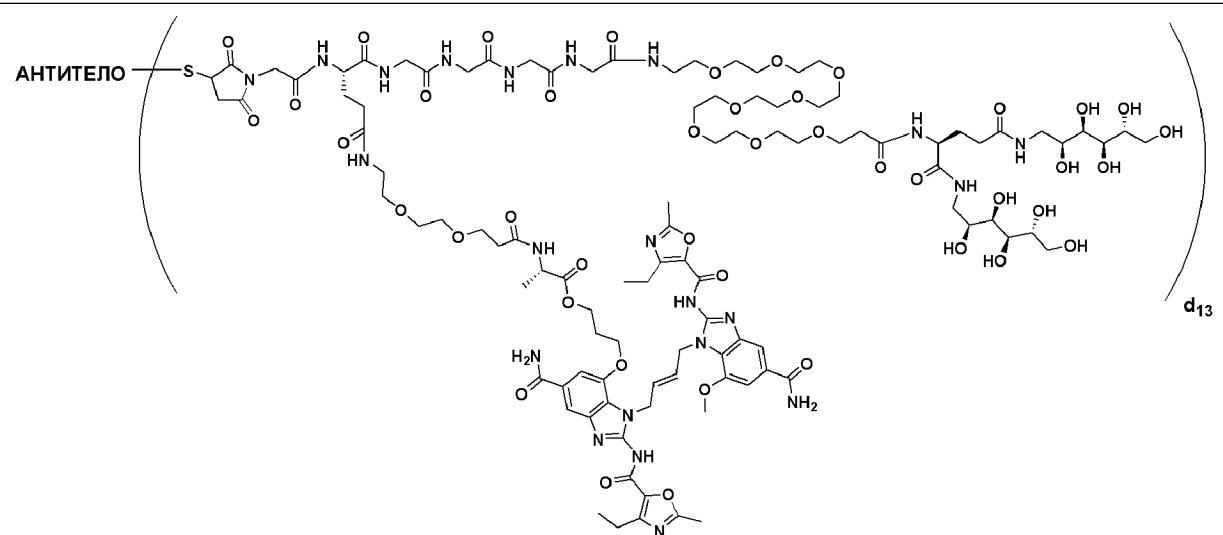
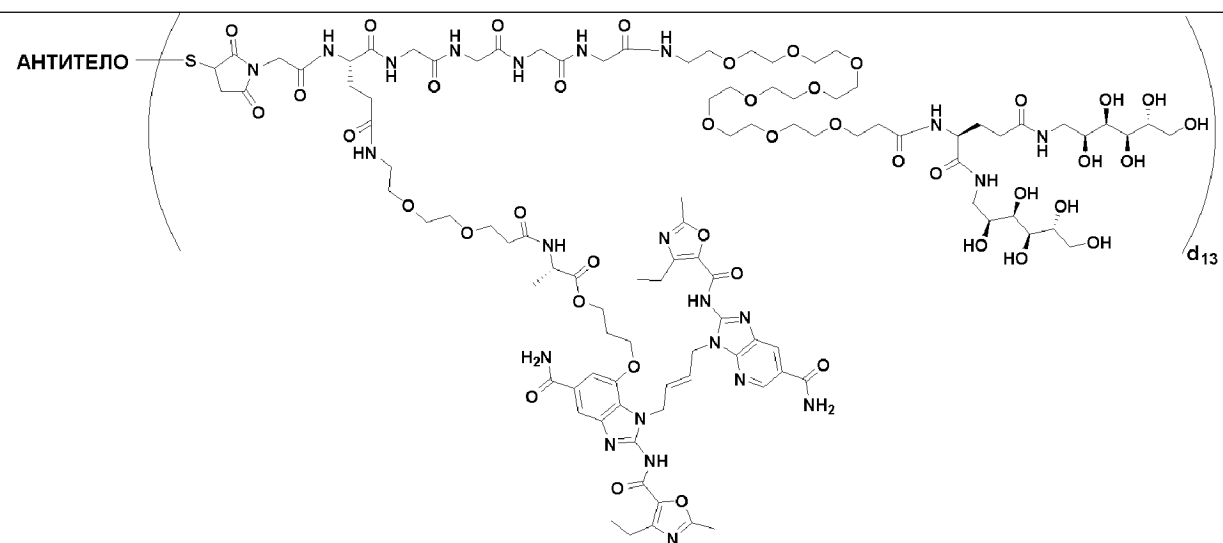
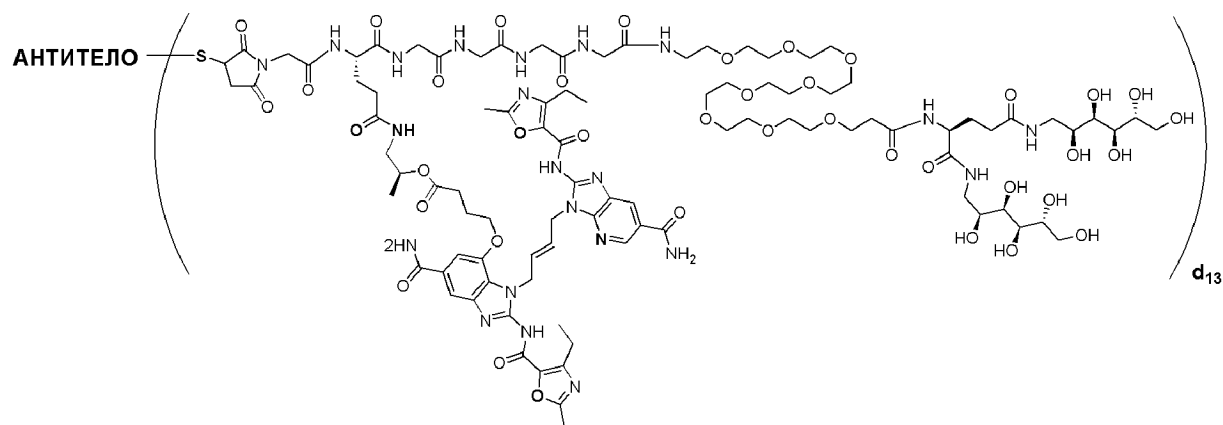


## Структура

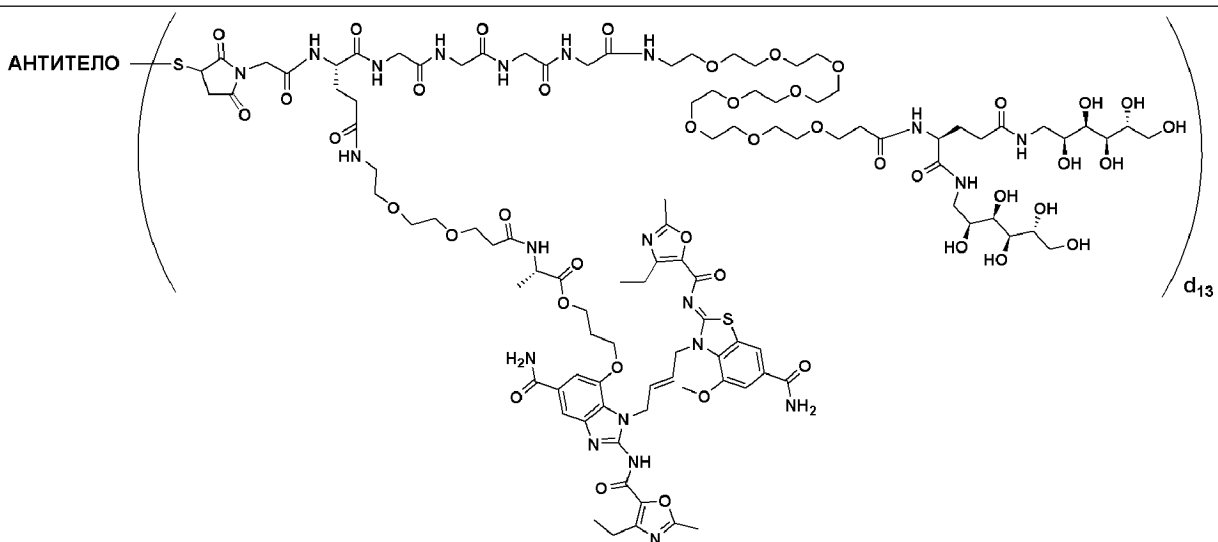
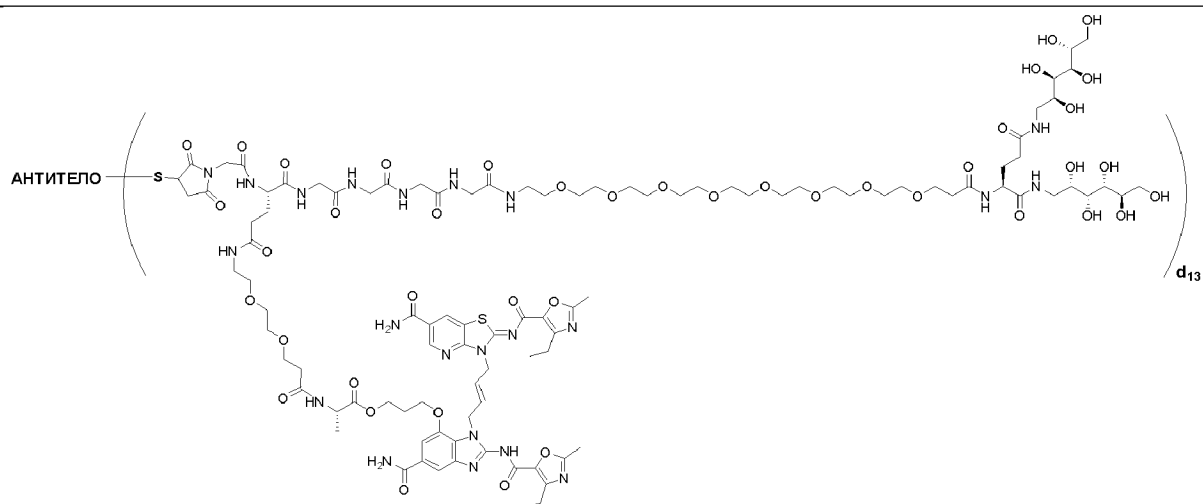
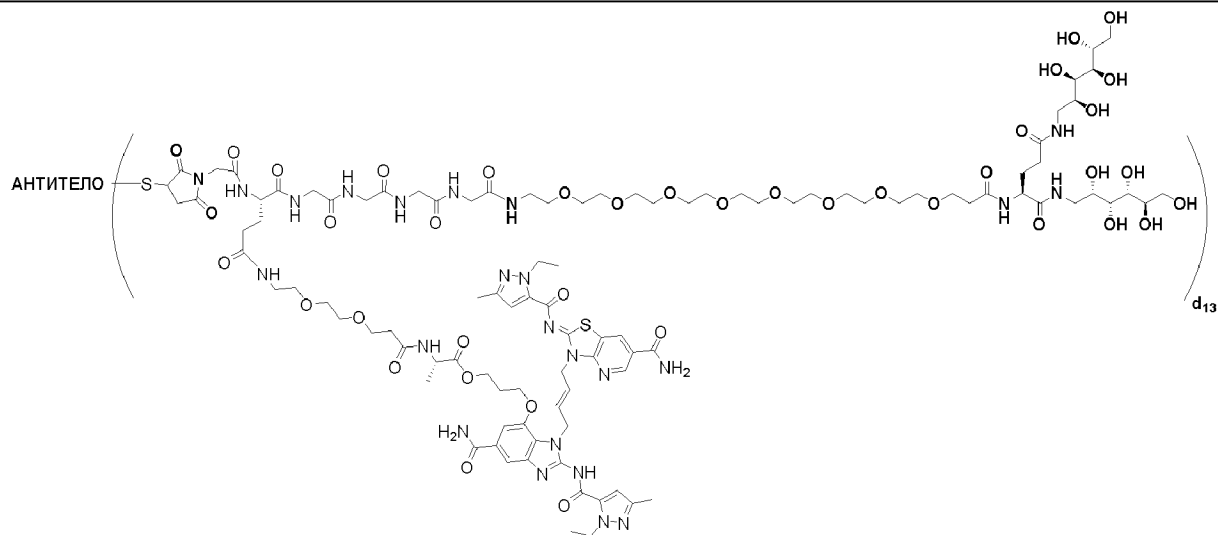




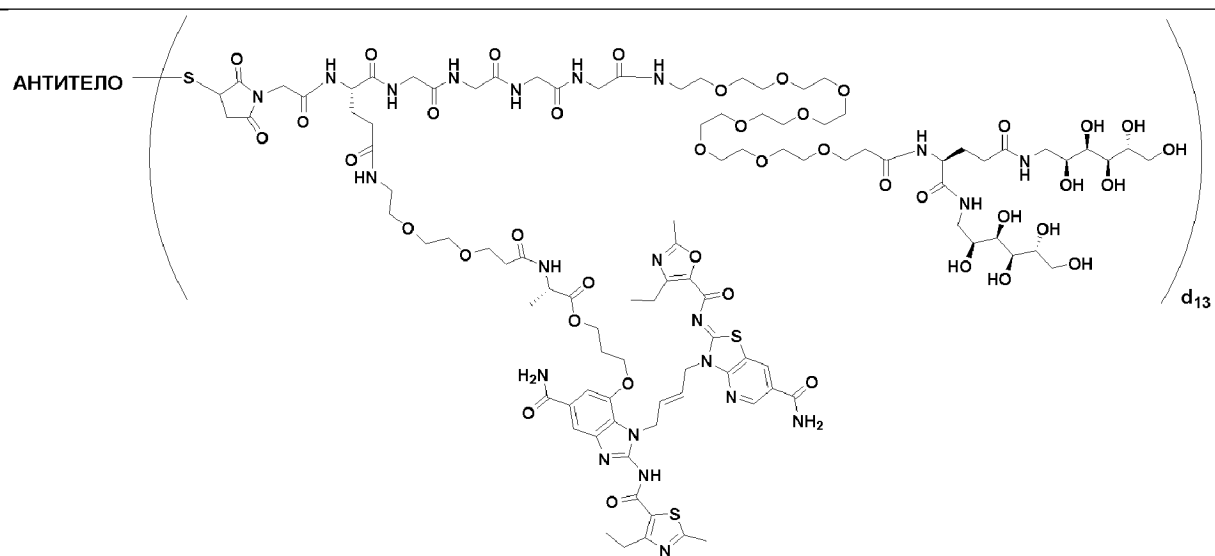
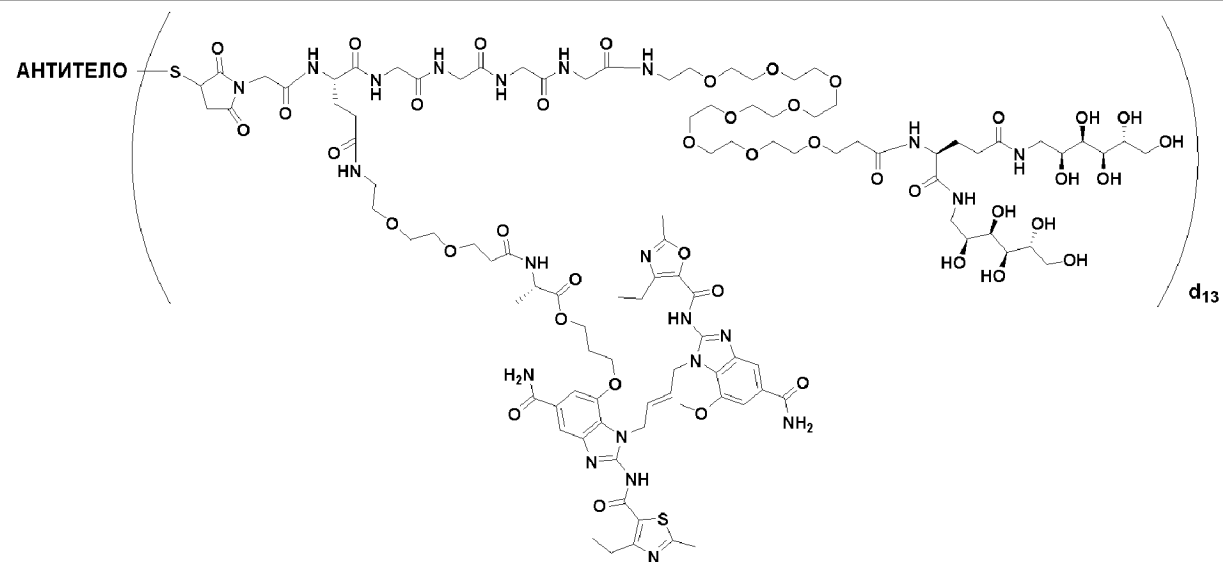
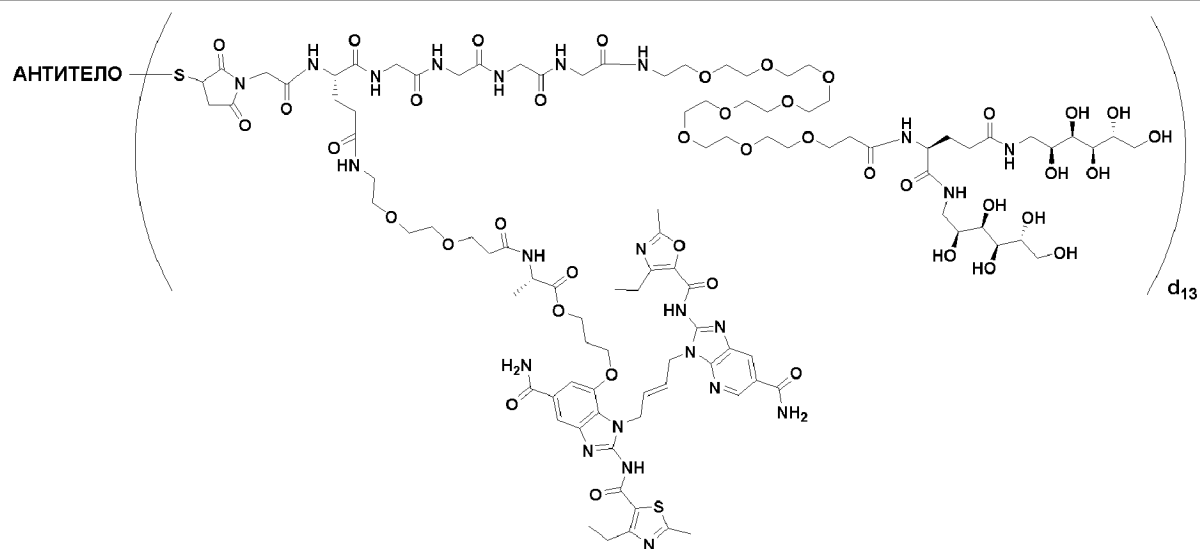
## Структура



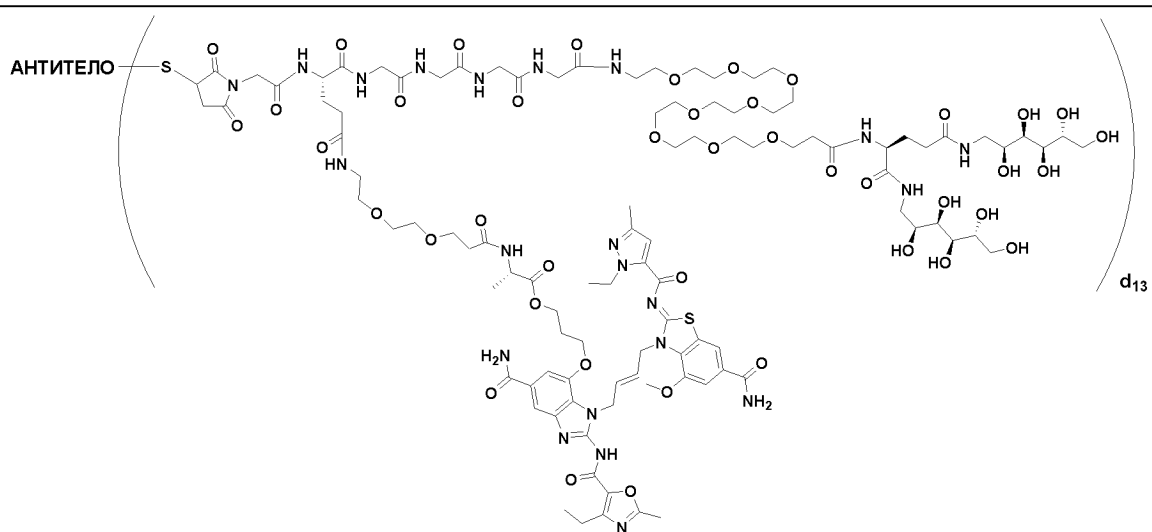
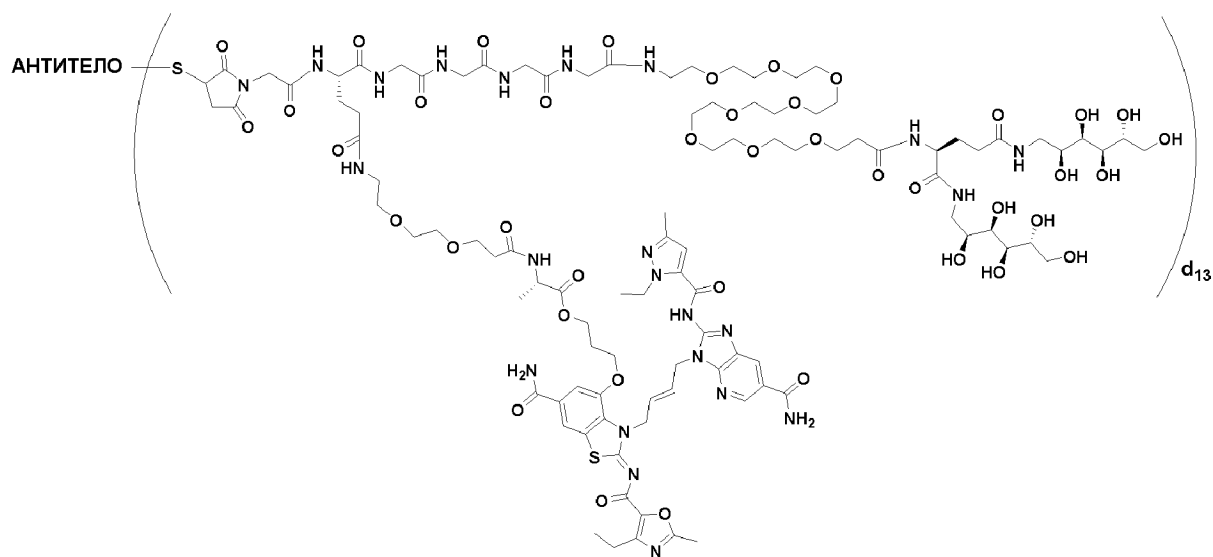
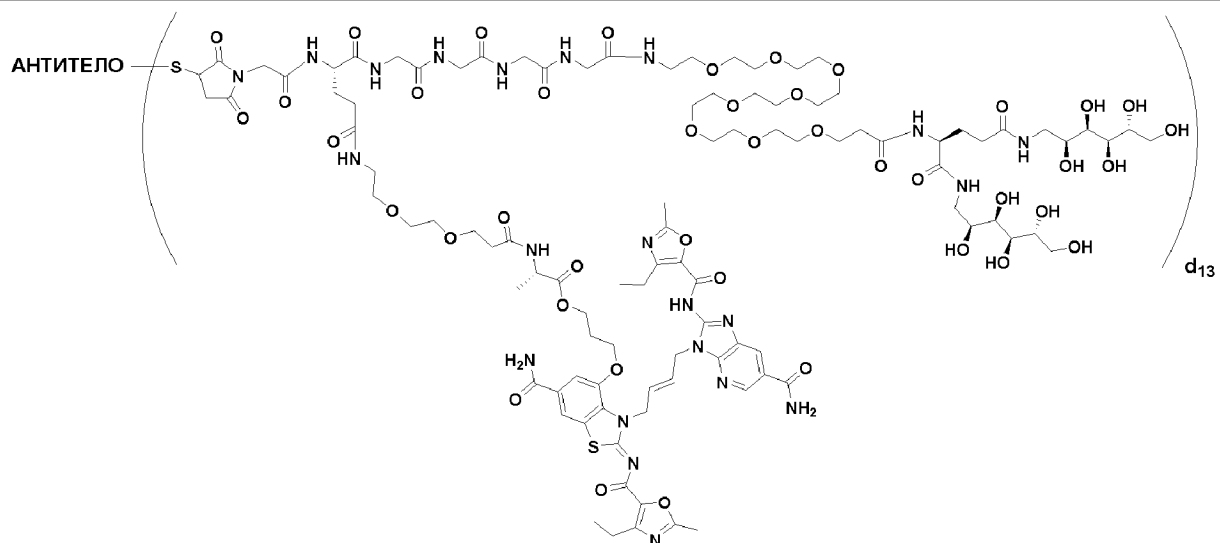
## Структура



## Структура

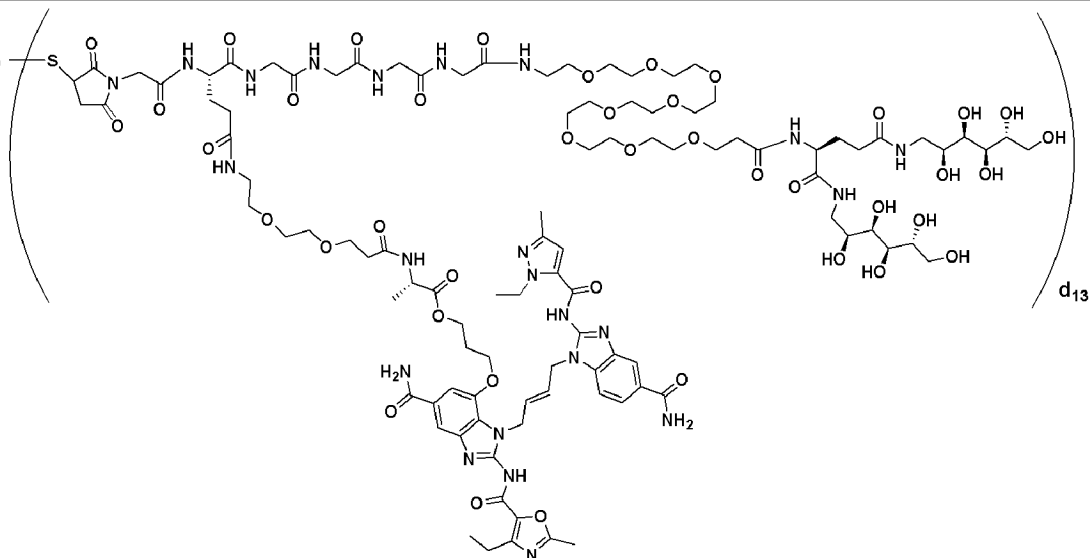


## Структура

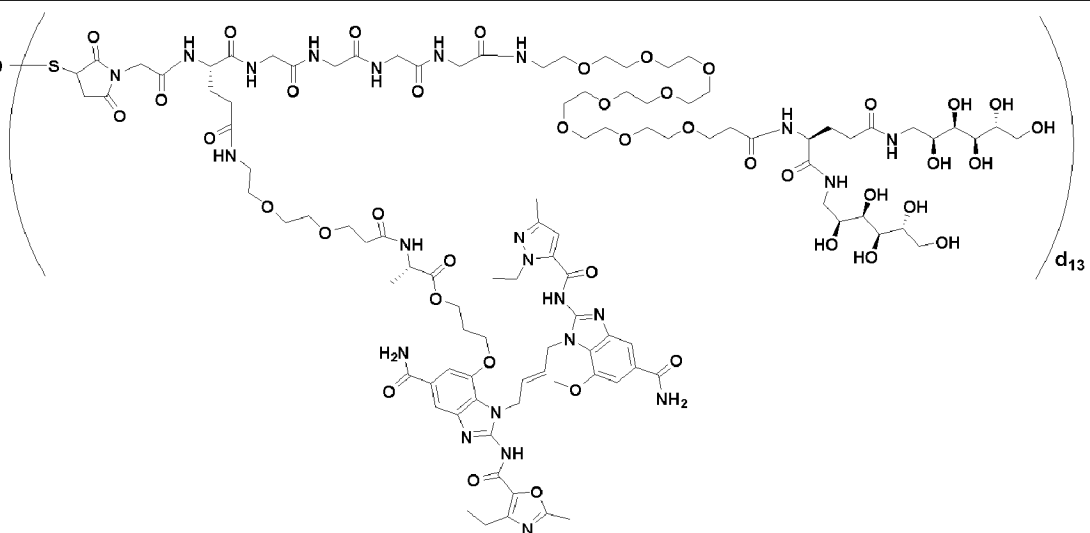


## Структура

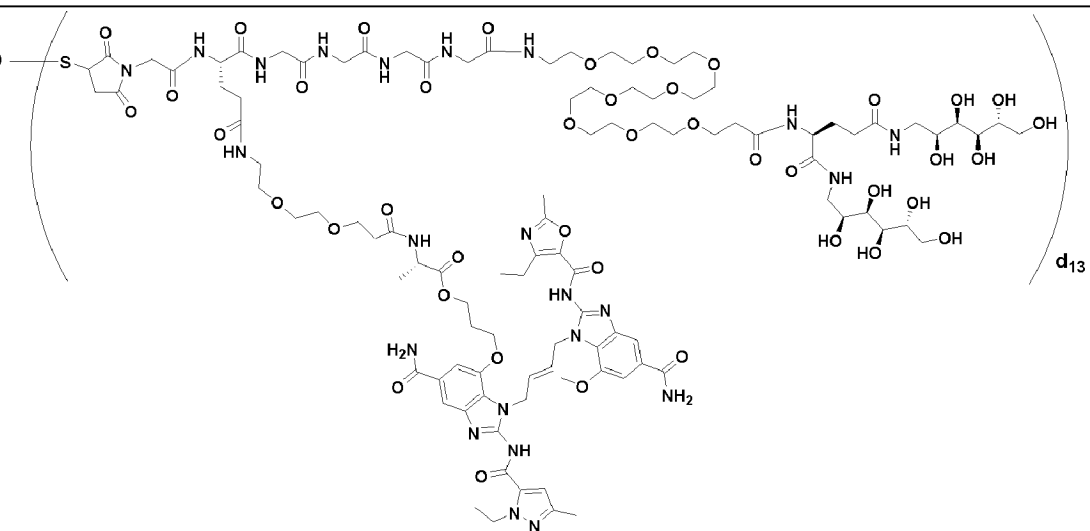
АНТИТЕЛО



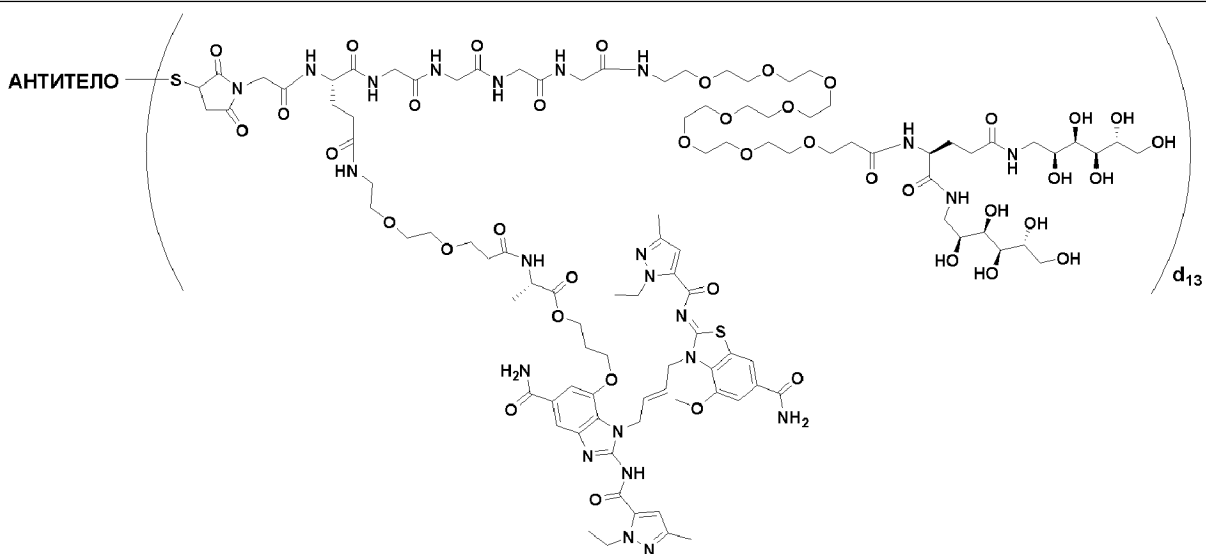
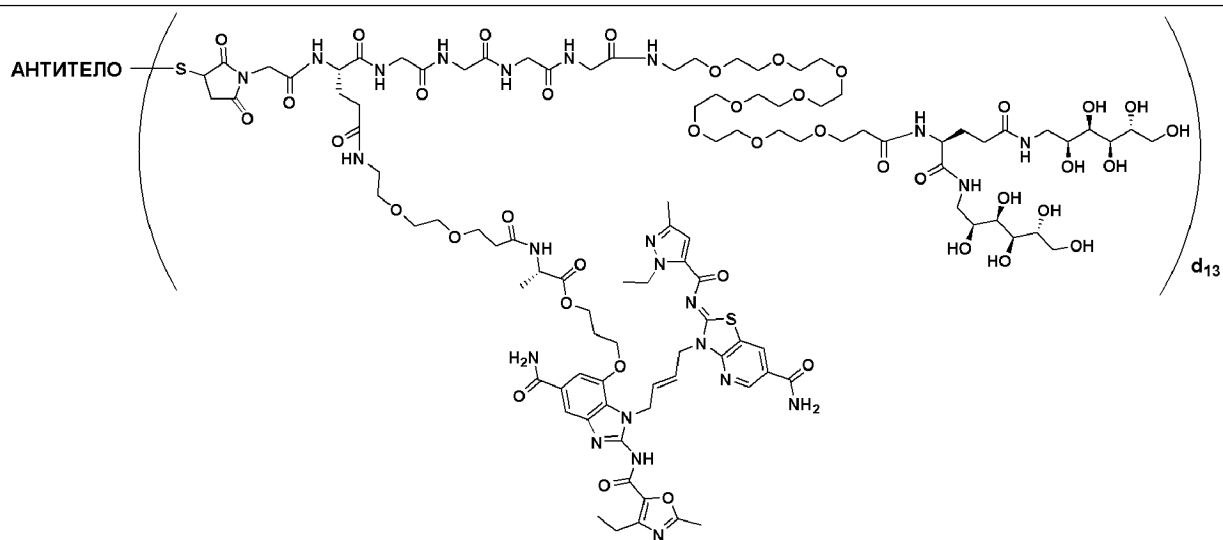
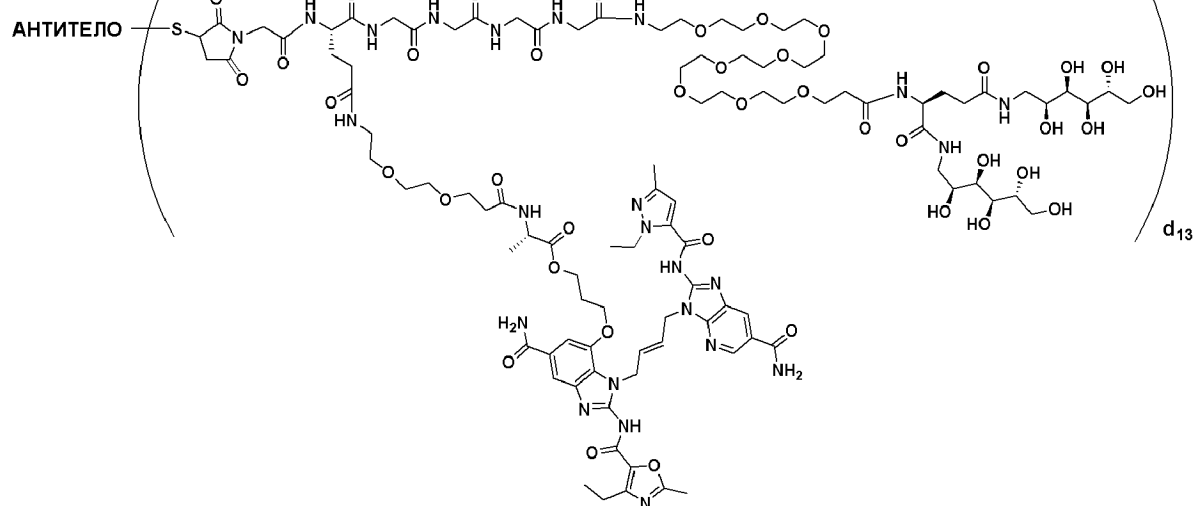
АНТИТЕЛО



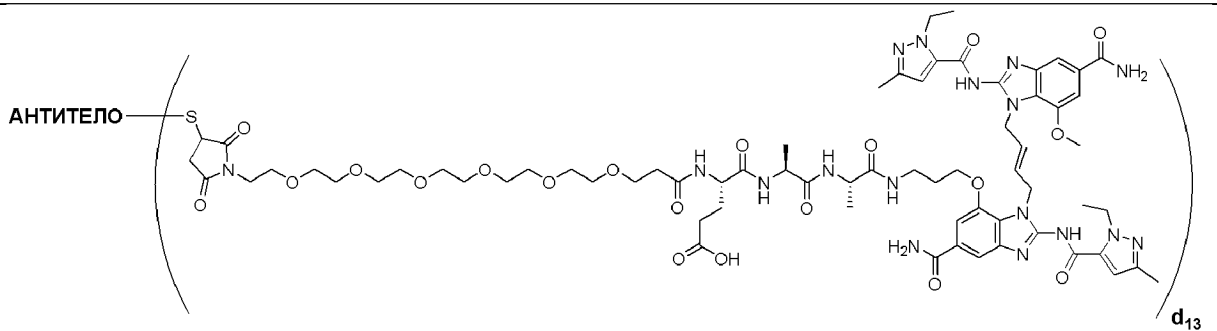
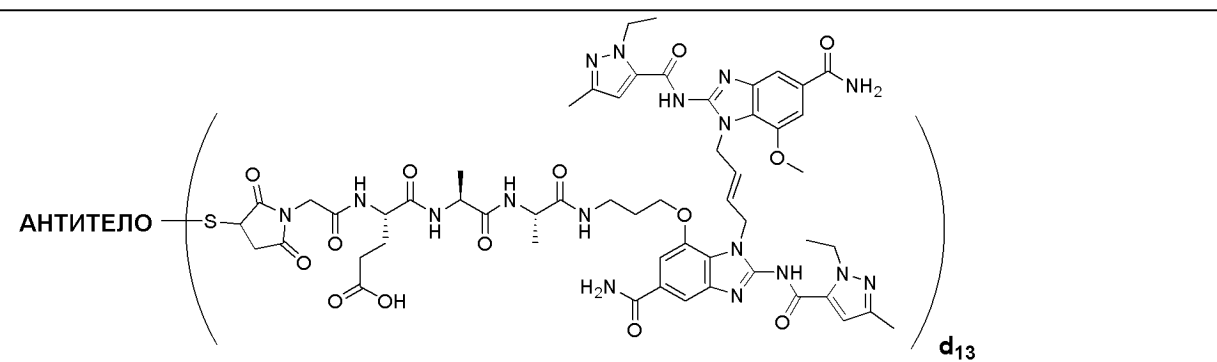
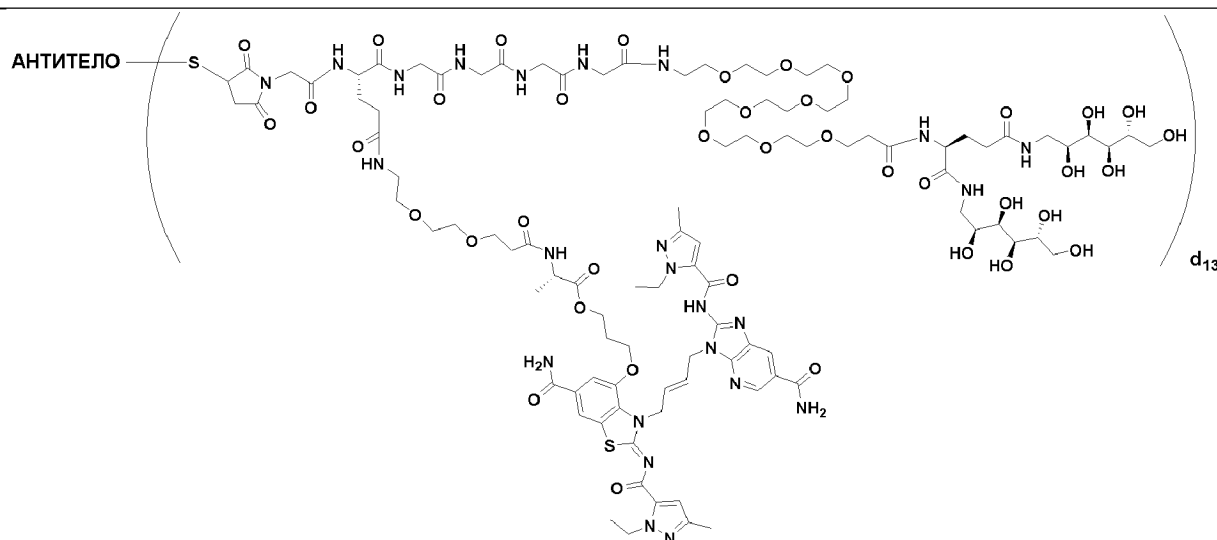
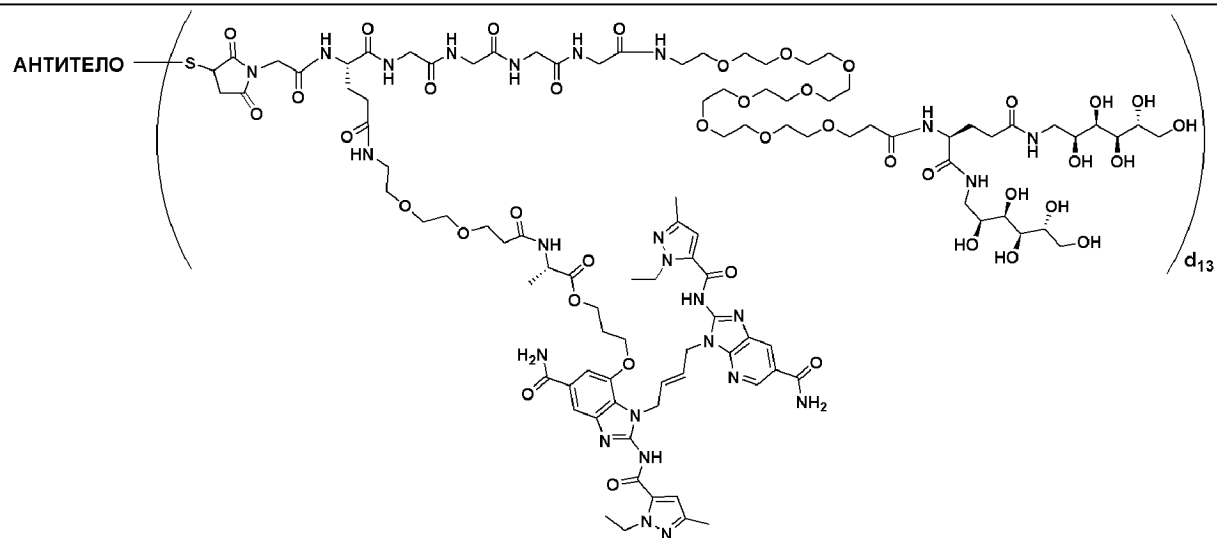
АНТИТЕЛО



## Структура



## Структура



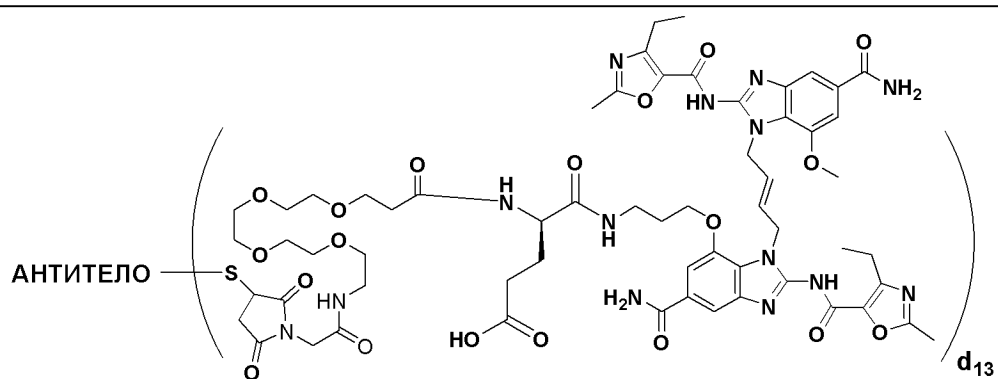
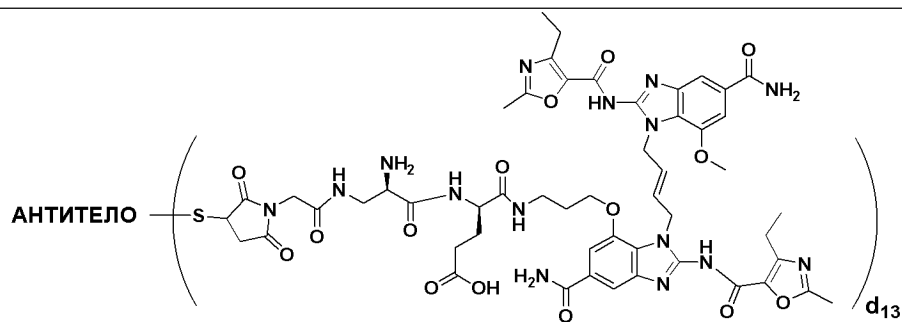
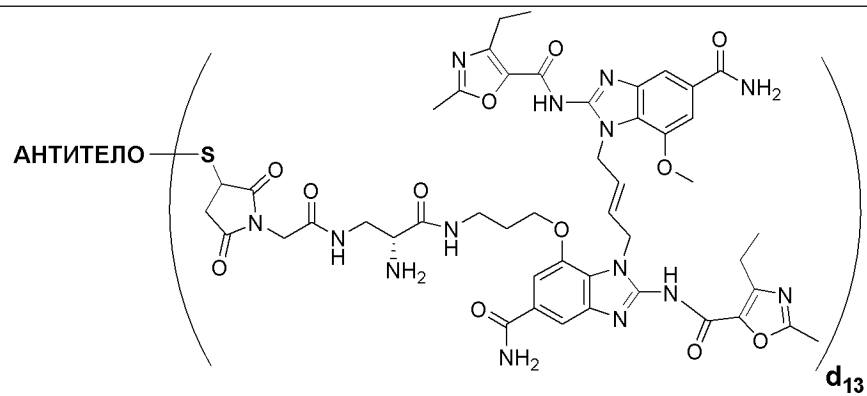
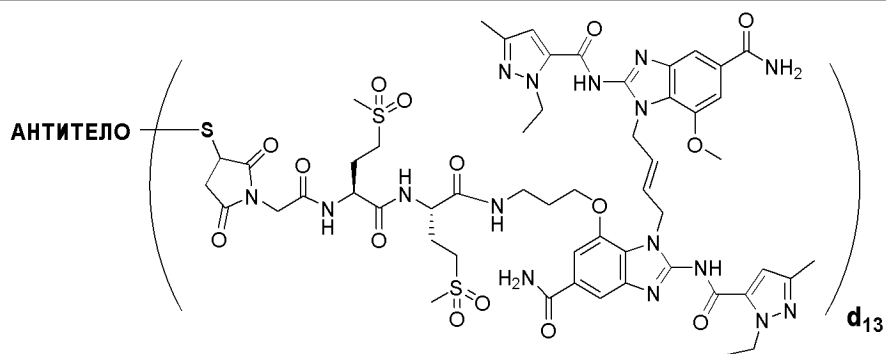

$$d_{13}$$

**d<sub>13</sub>**

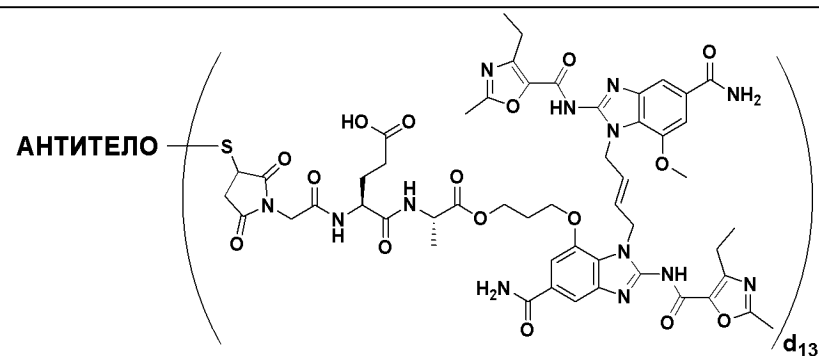
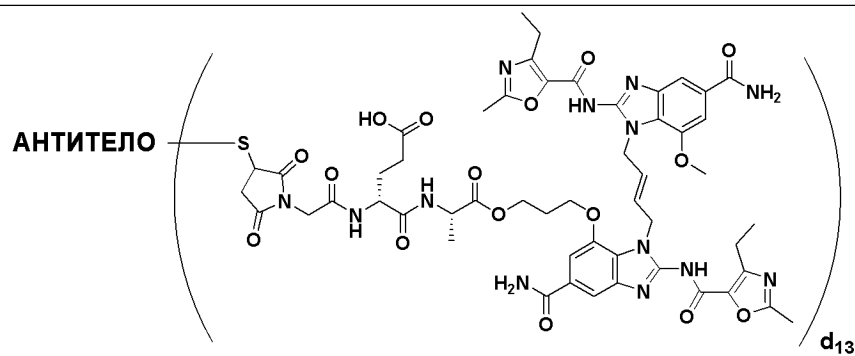
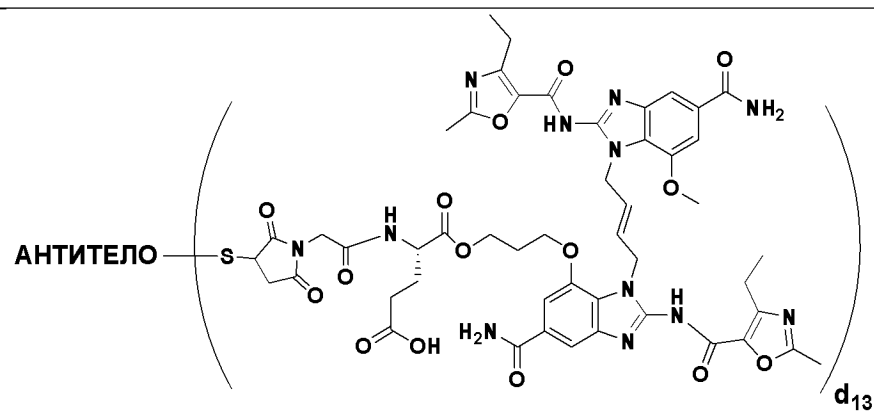
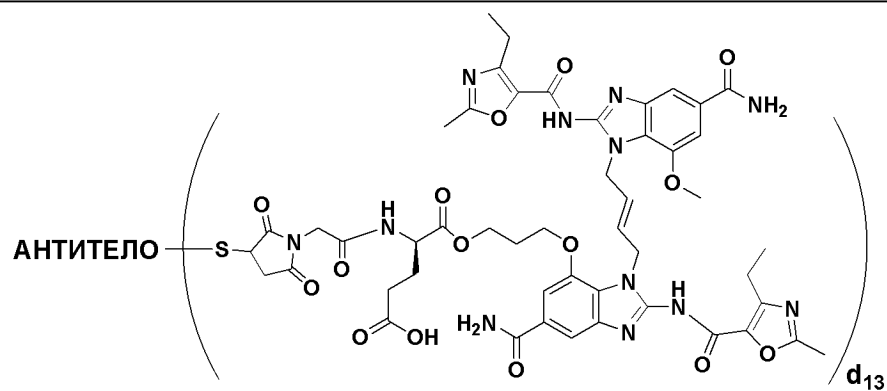
 $\text{d}_{13}$ 
$$d_{13}$$
 $d_{13}$



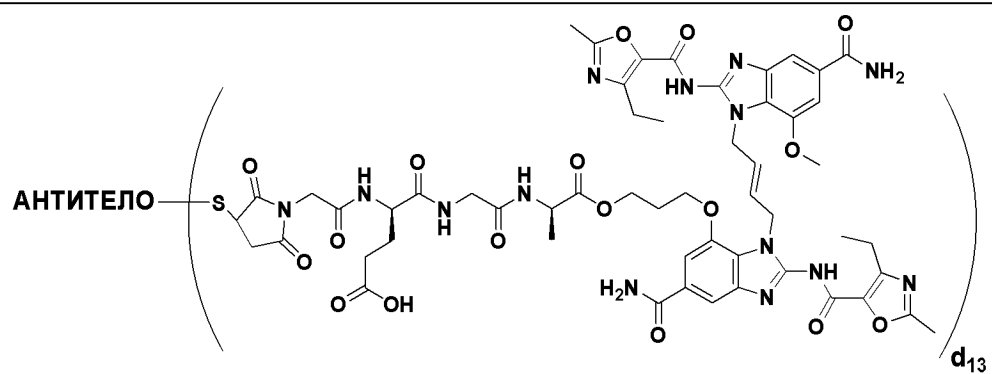
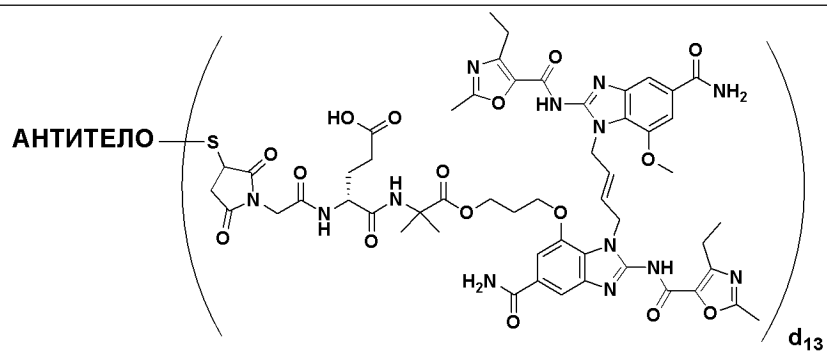
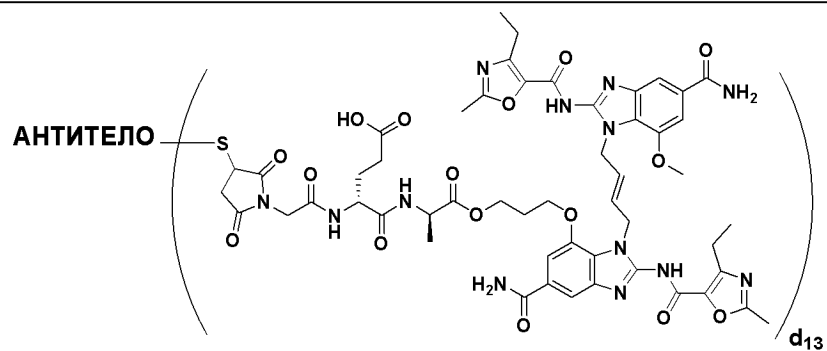
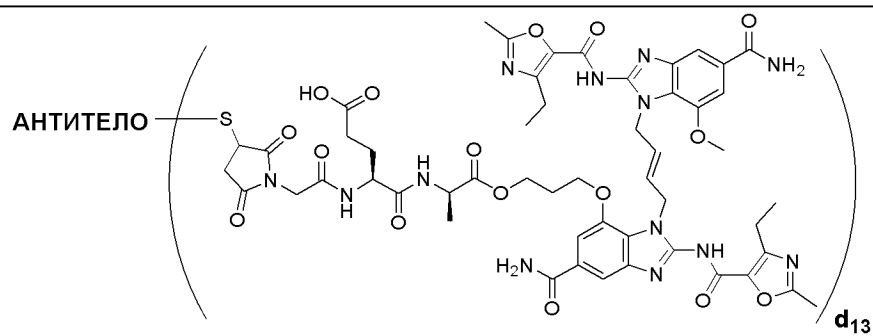
## Структура



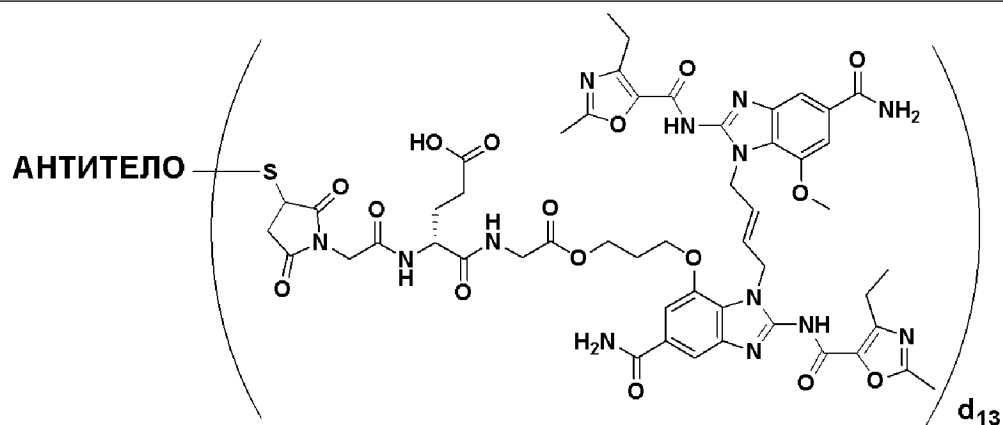
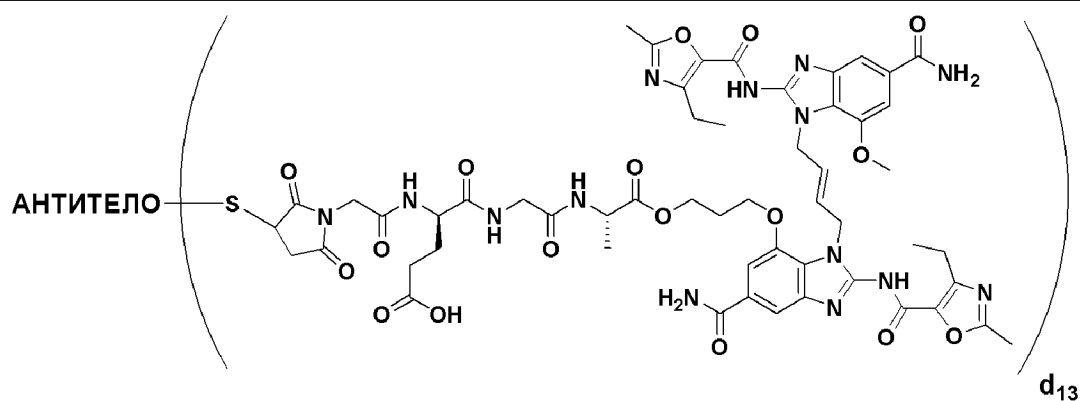
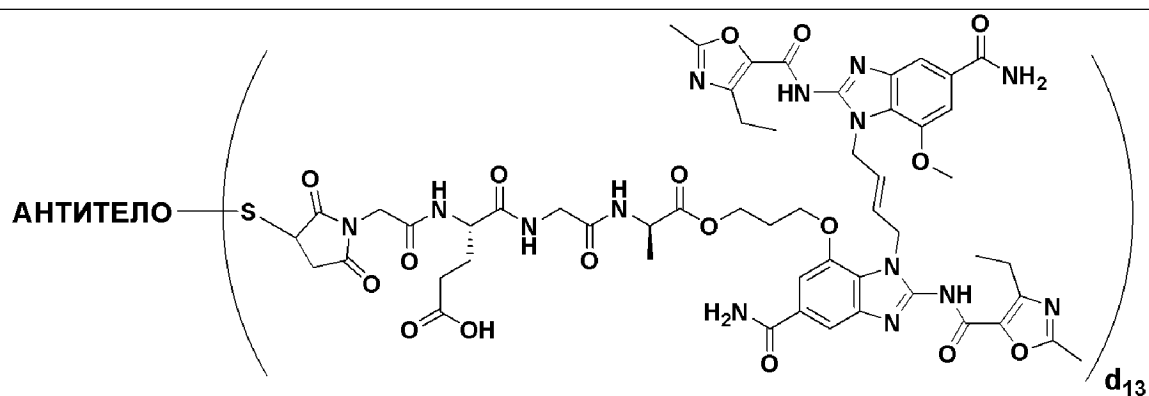
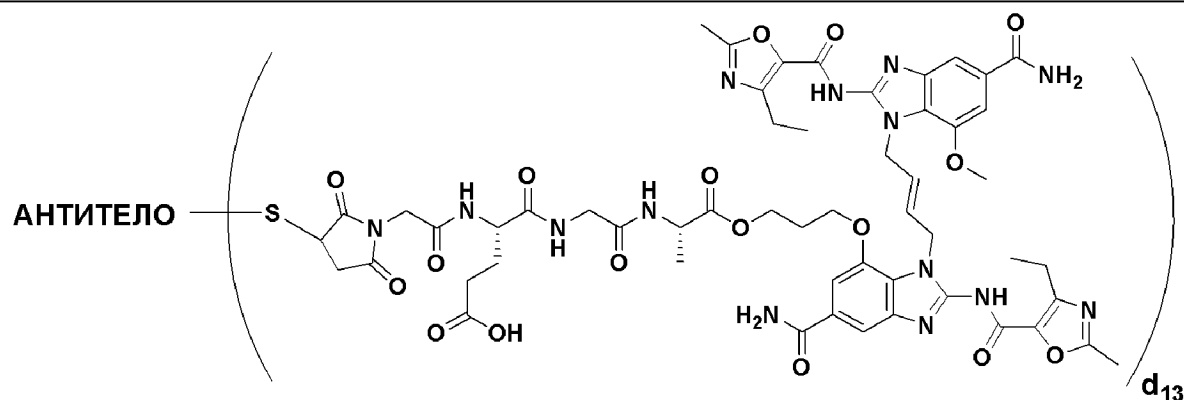
## Структура



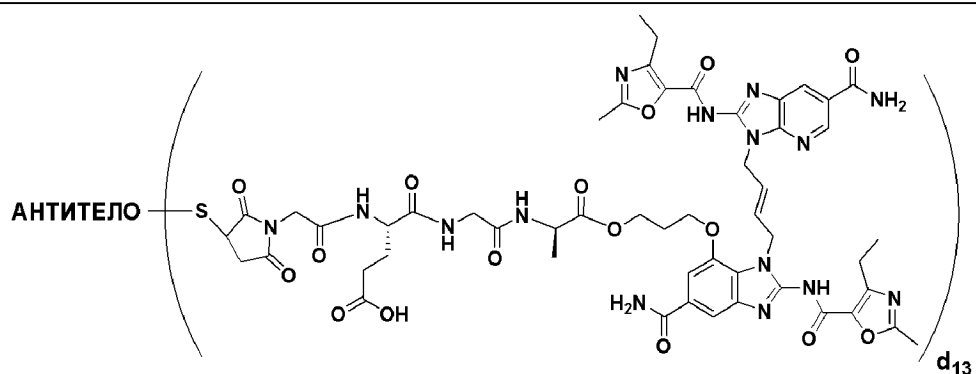
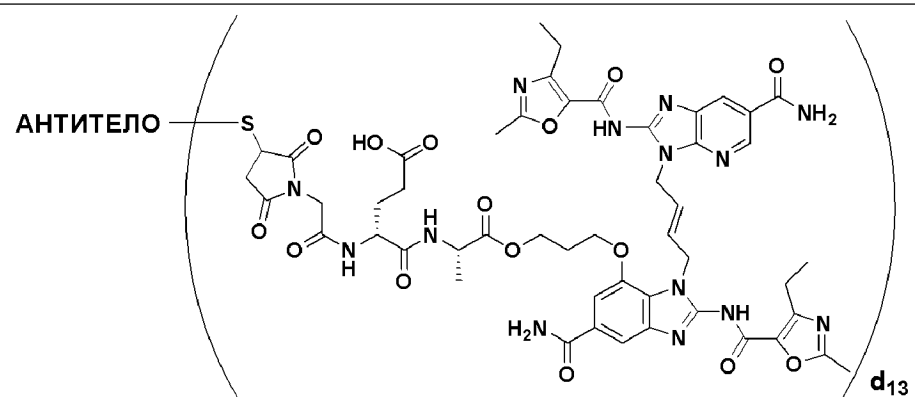
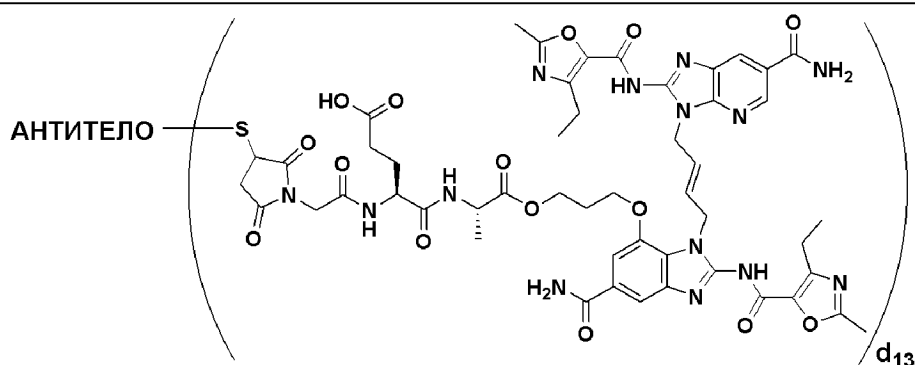
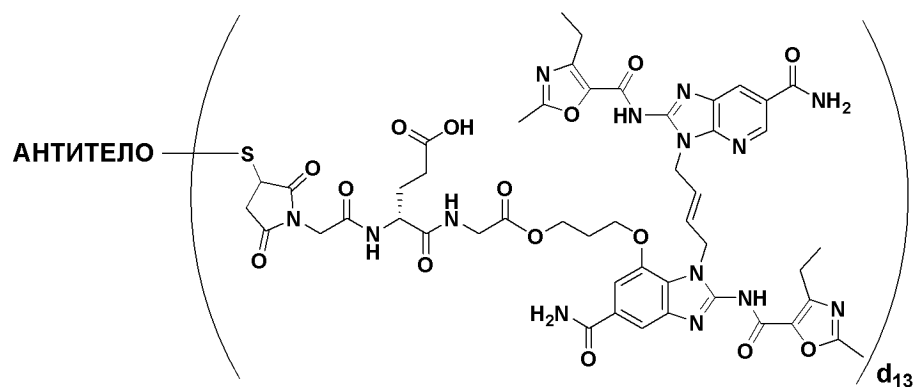
## Структура



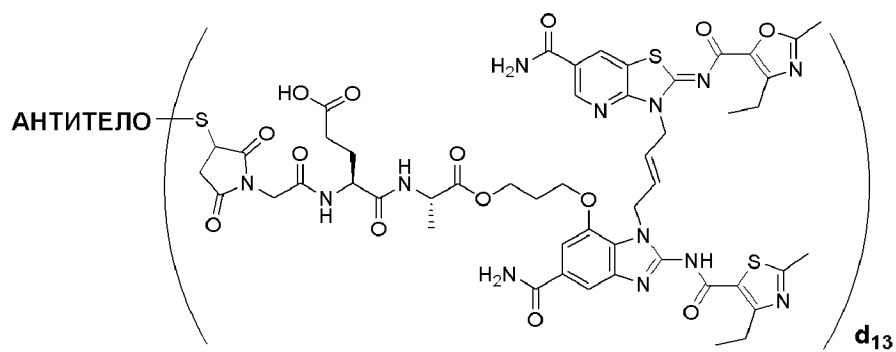
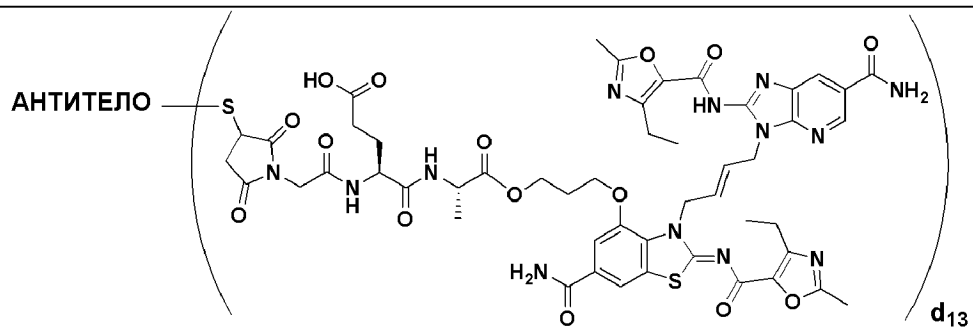
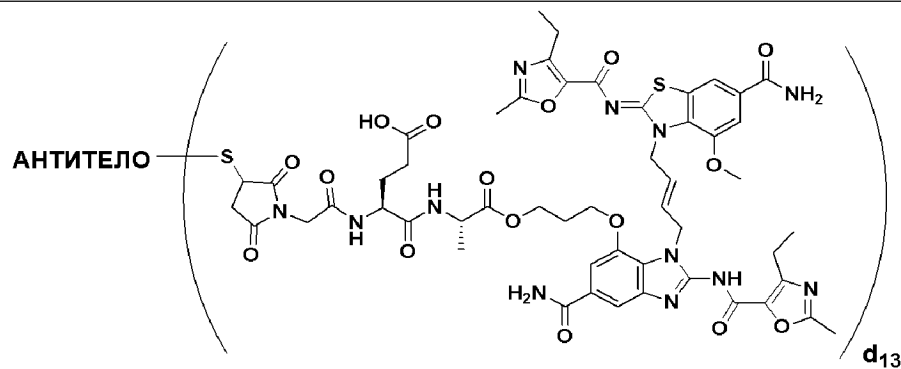
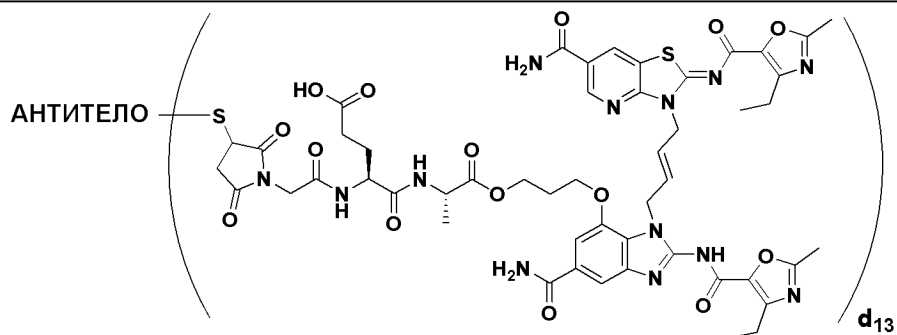
## Структура

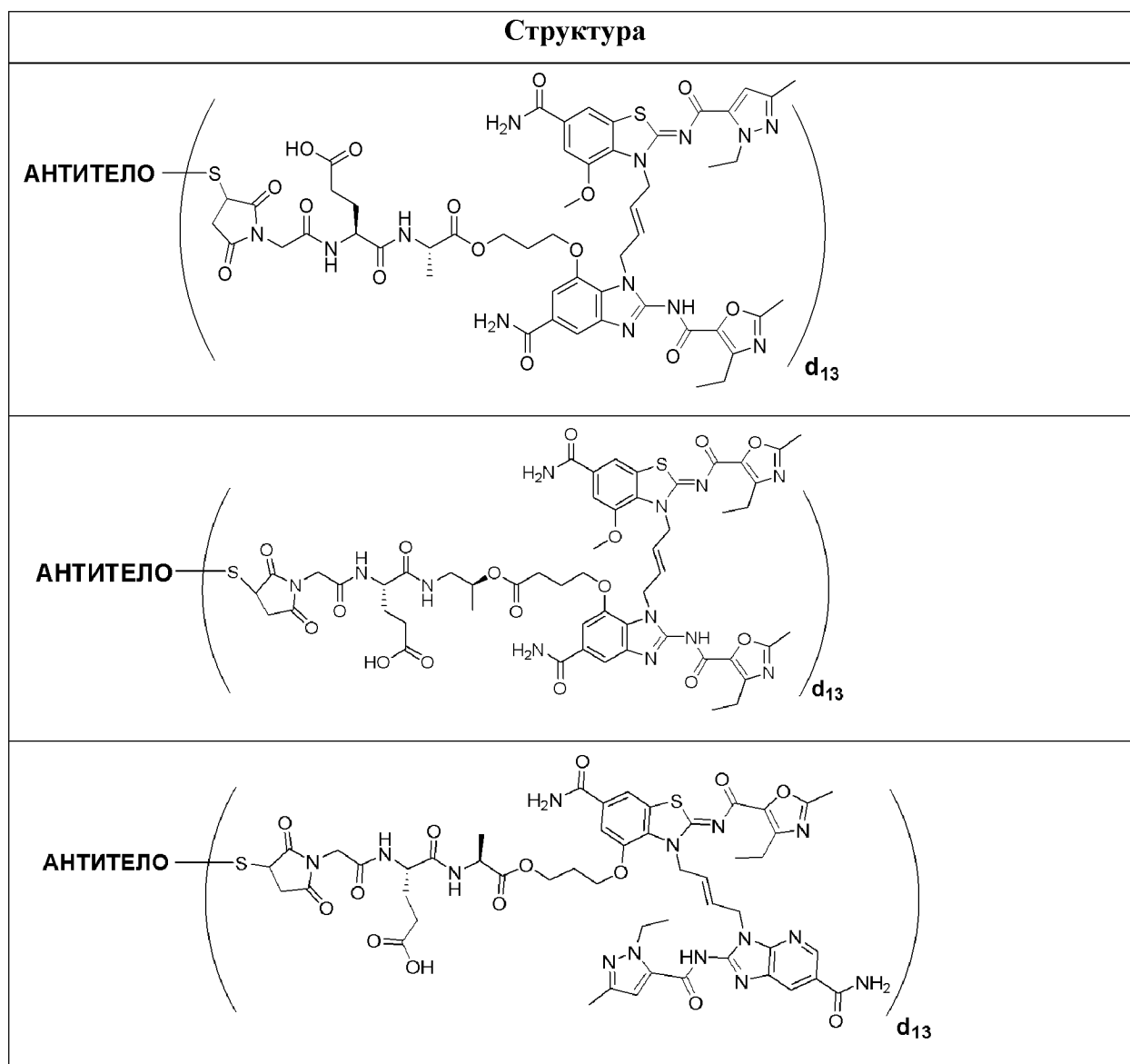


## Структура



## Структура





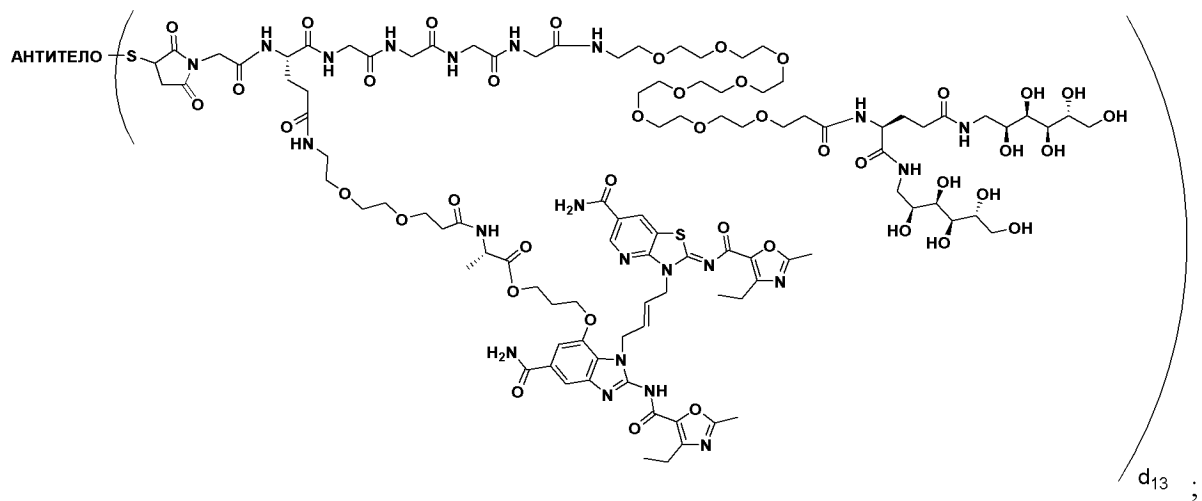
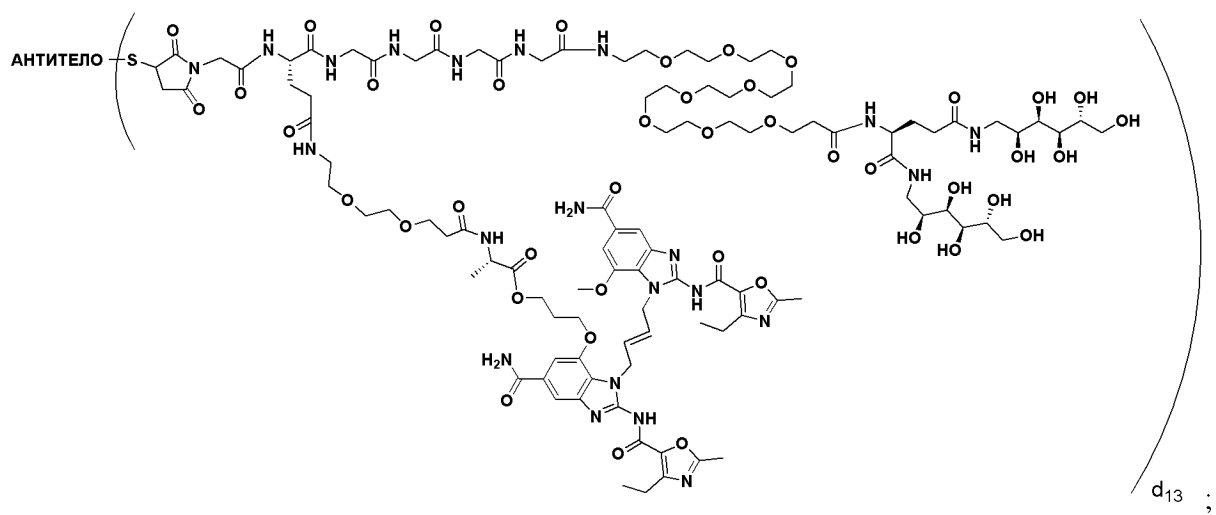
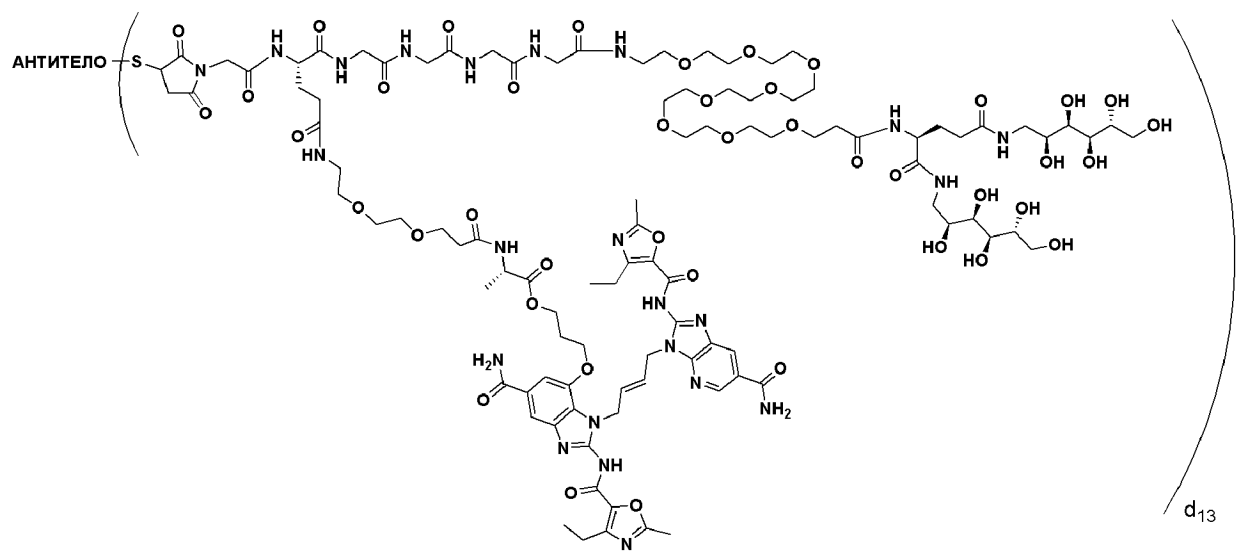
где  $d_{13}$  является таким, как определено в настоящем описании, и АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4.

**[698]** В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А2,  $d_{13}$  представляет собой целое число от 6 до 8.

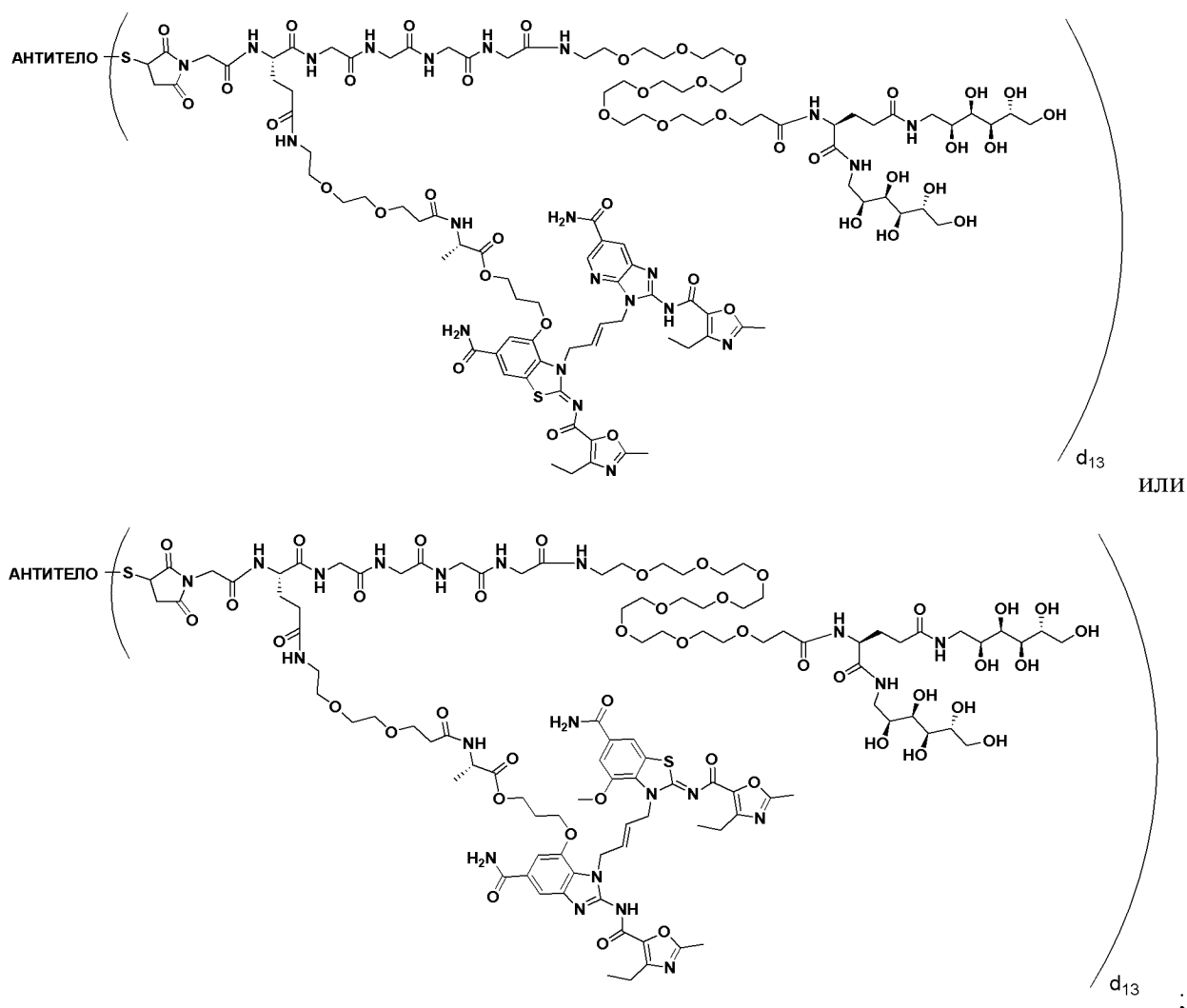
**[699]** В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А2,  $d_{13}$  равен 8. В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А2,  $d_{13}$  равен 7. В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А2,  $d_{13}$  равен 6.

**[700]** В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, приведенных в таблице А2,  $d_{13}$  равен 8.

**[701]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат лекарственного средства-агониста STING представляет собой:





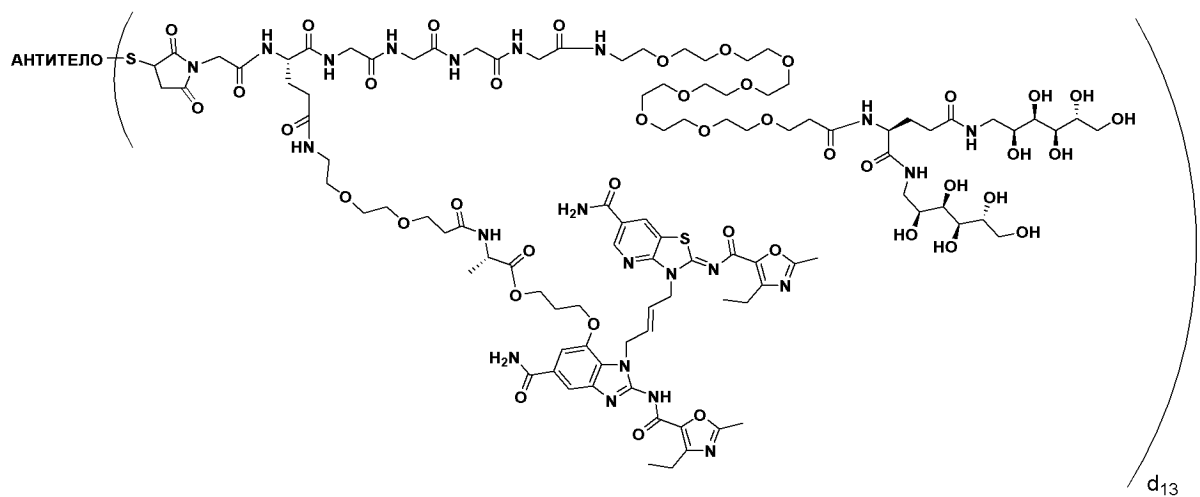
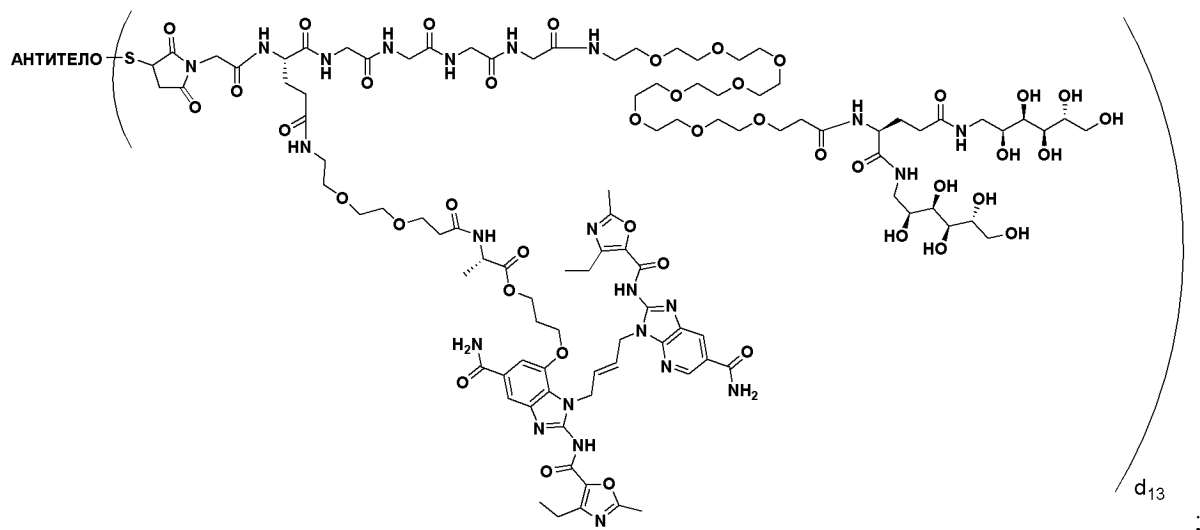


где  $d_{13}$  равен 8 и АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4,

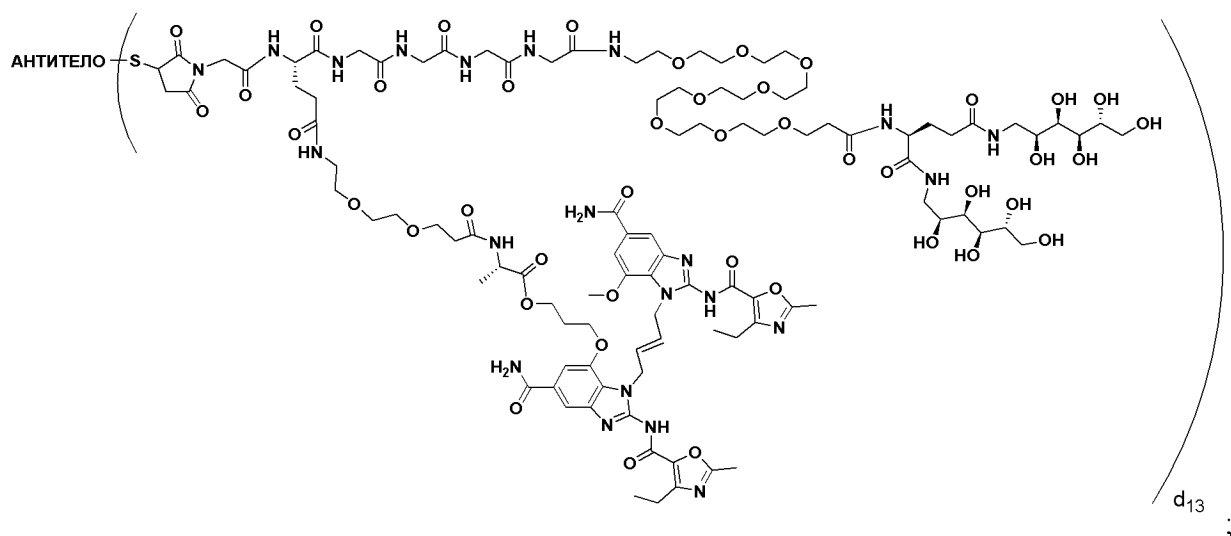
где антитело против В7-Н4 содержит определяющую комплементарность область 1 переменной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 переменной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 переменной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 переменной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 переменной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 переменной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

[702] В некоторых вариантах осуществления конъюгатов лекарственного средства-

агониста STING представляет собой:



ИЛИ

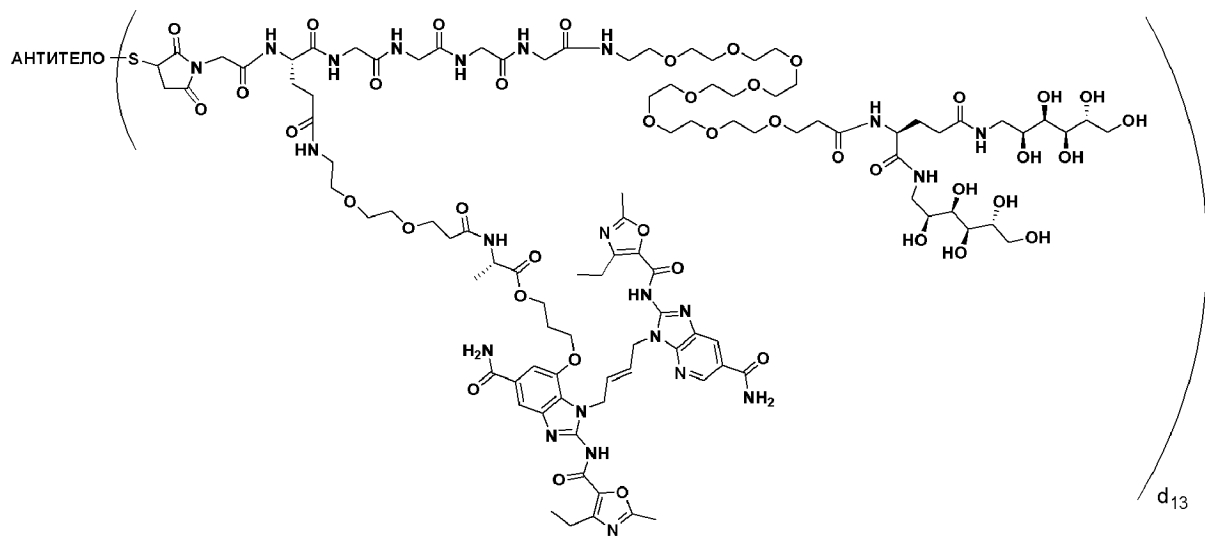


где  $d_{13}$  равен 8 и АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4,

где антитело против В7-Н4 содержит определяющую комплементарную область 1

вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRТ (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

[703] В некоторых вариантах осуществления конъюгат лекарственное средство-агонист STING представляет собой:



где  $d_{13}$  равен 8 и АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4, или  $d_{13}$  равен 2 и АНТИТЕЛО представляет собой антитело с встроенным цистеином против В7-Н4,

где антитело против В7-Н4 содержит определяющую комплементарность область 1 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRТ (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность

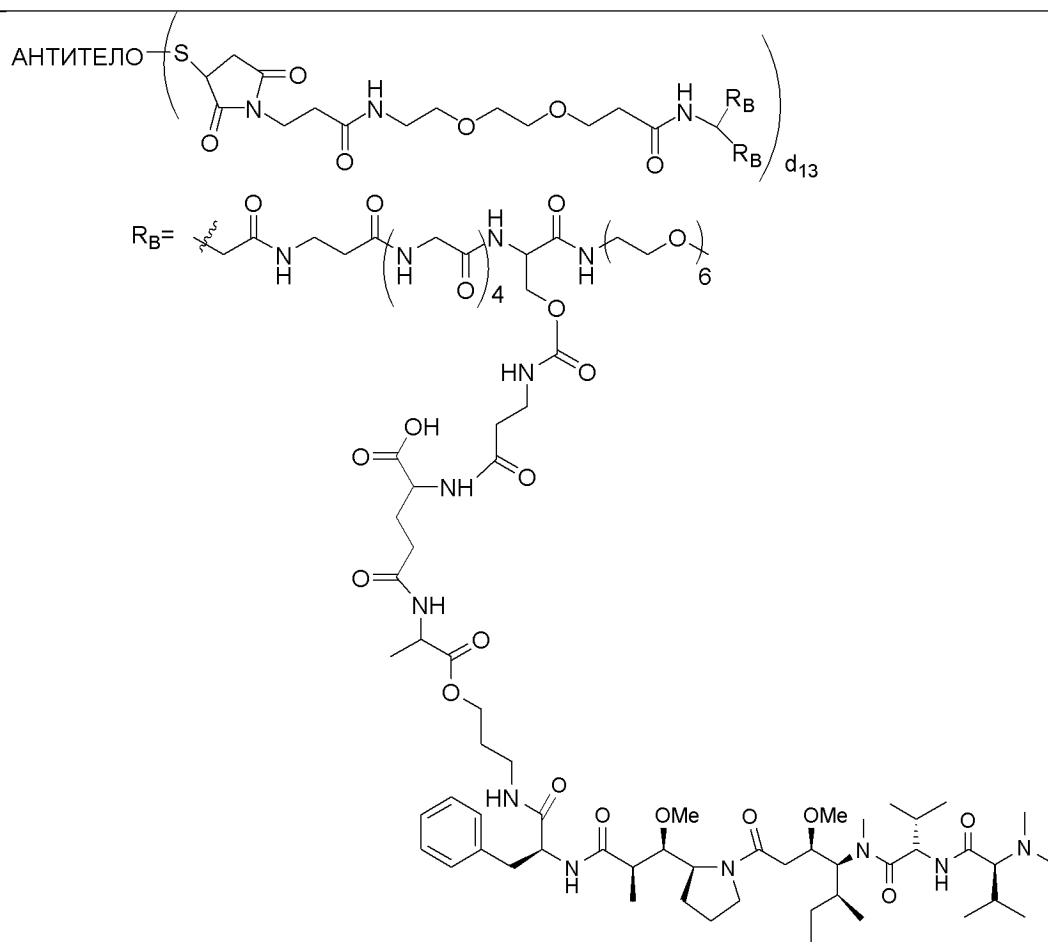
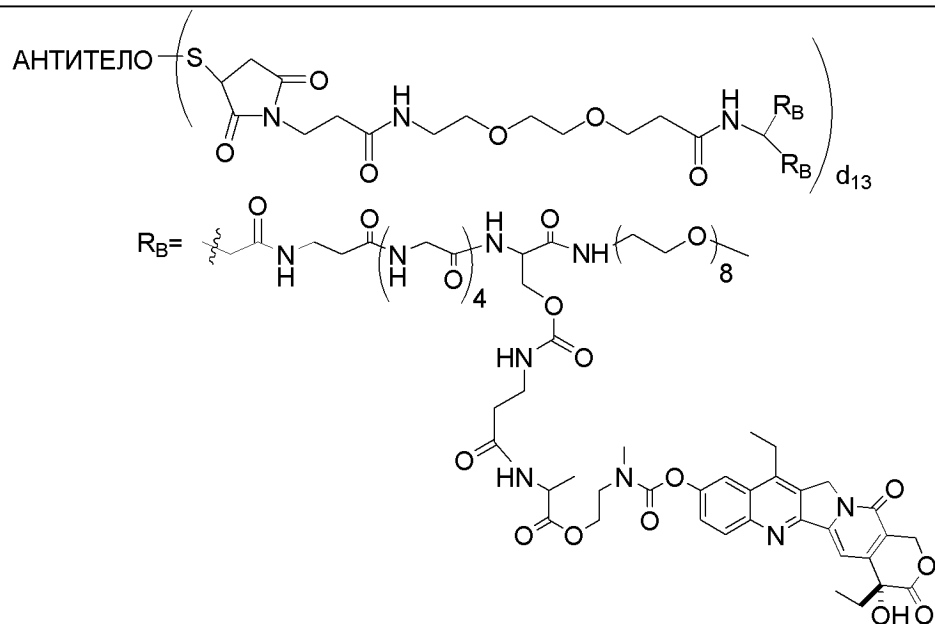
область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

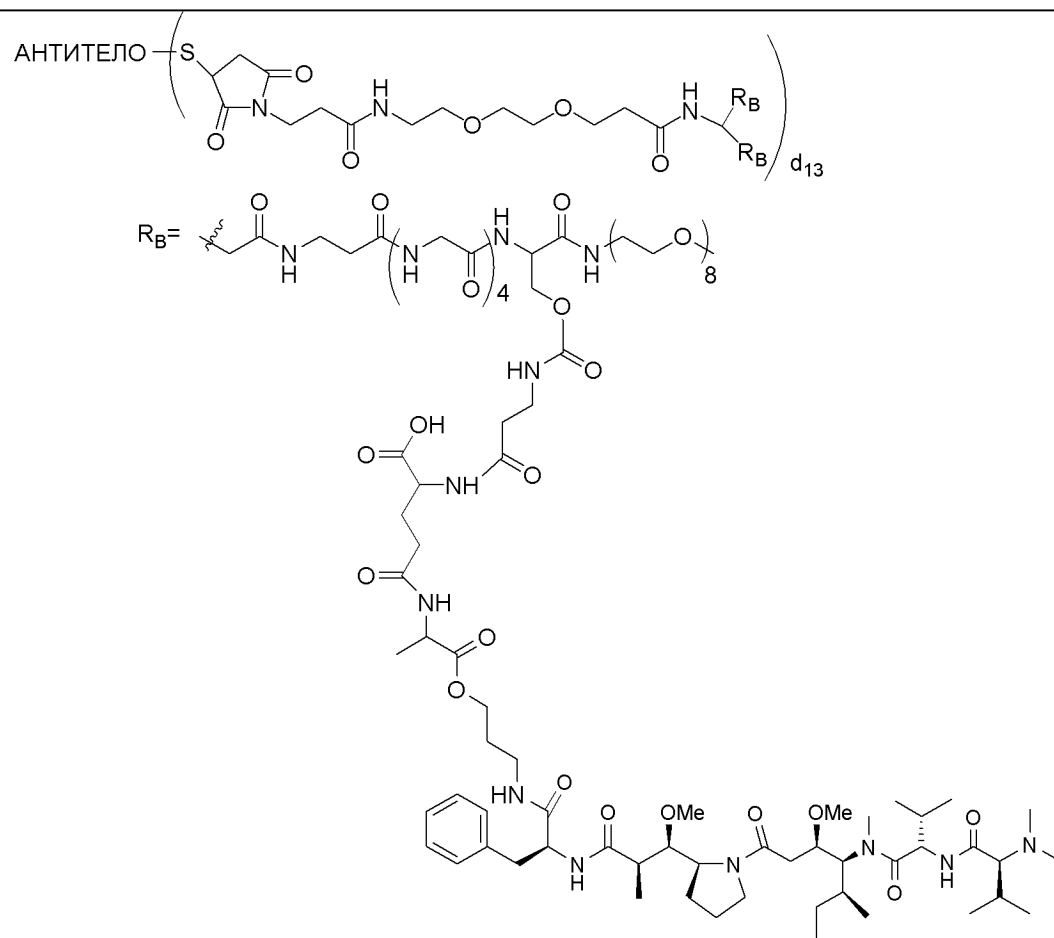
**[704]** В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 или антитело с встроенным цистеином против B7-H4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, выбрано из конъюгатов, описанных в таблице B1.

**Таблица B1**

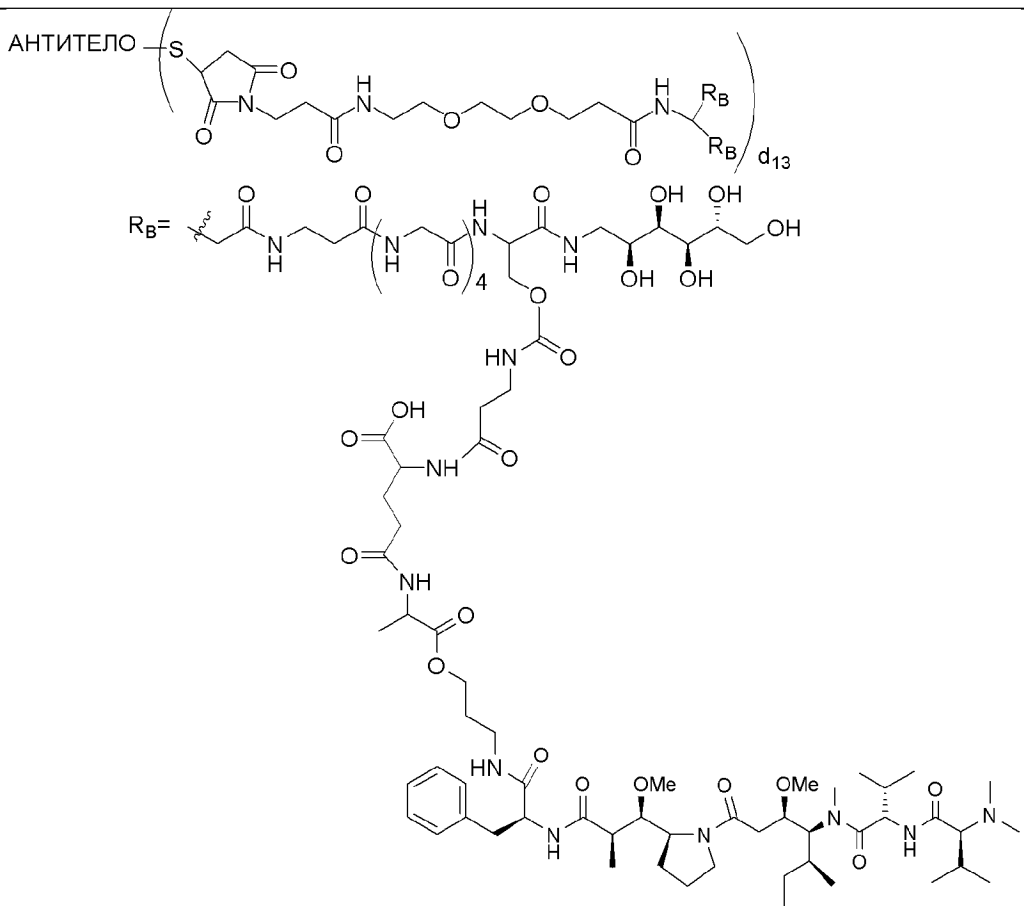
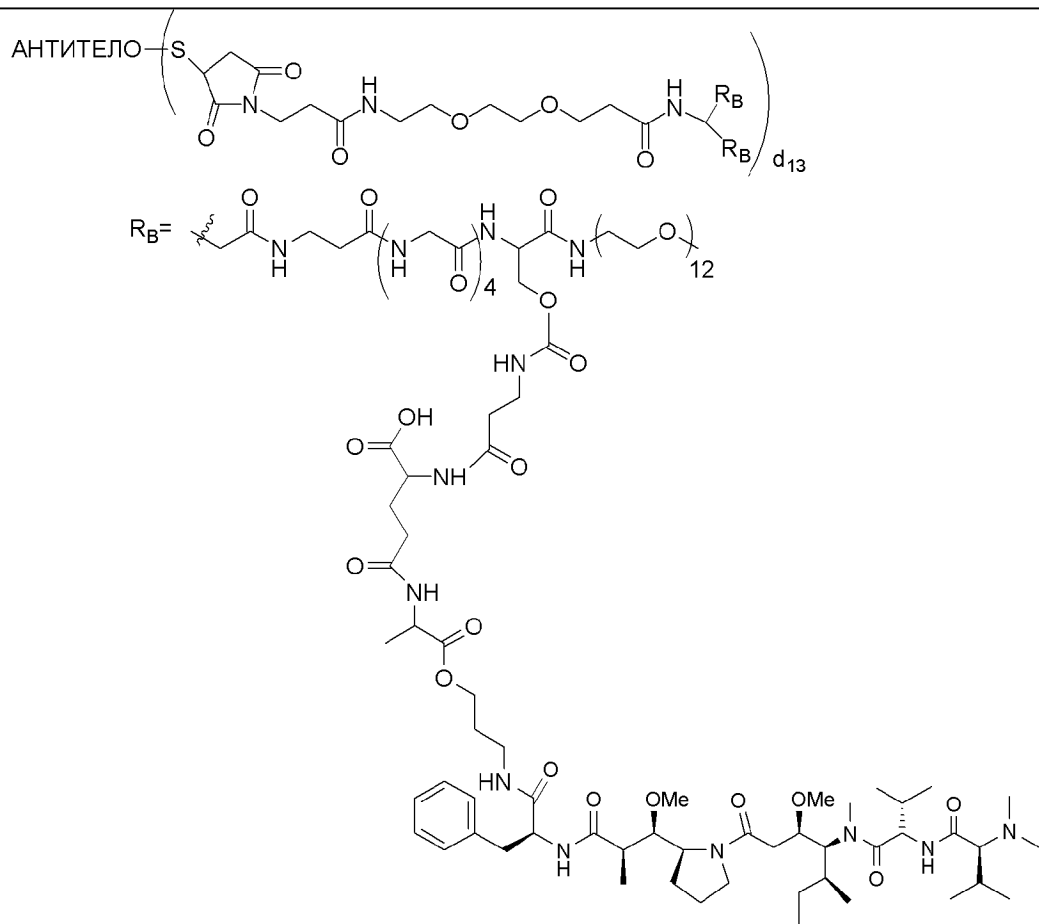
| Структура                                            |
|------------------------------------------------------|
| <p>АНТИТЕЛО-S</p> <p><math>R_B =</math> </p> <p></p> |
| <p>АНТИТЕЛО-S</p> <p><math>R_B =</math> </p> <p></p> |

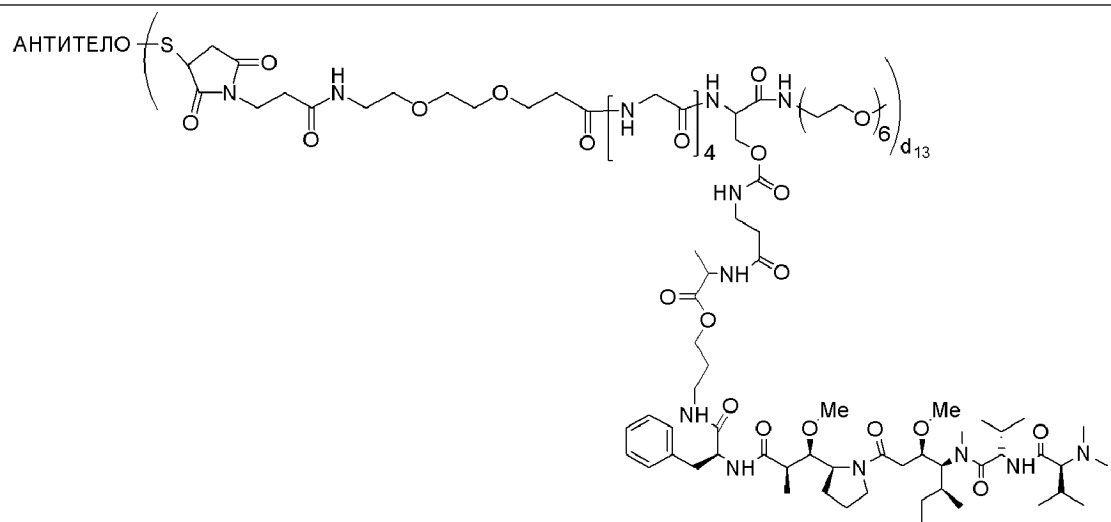
## Структура



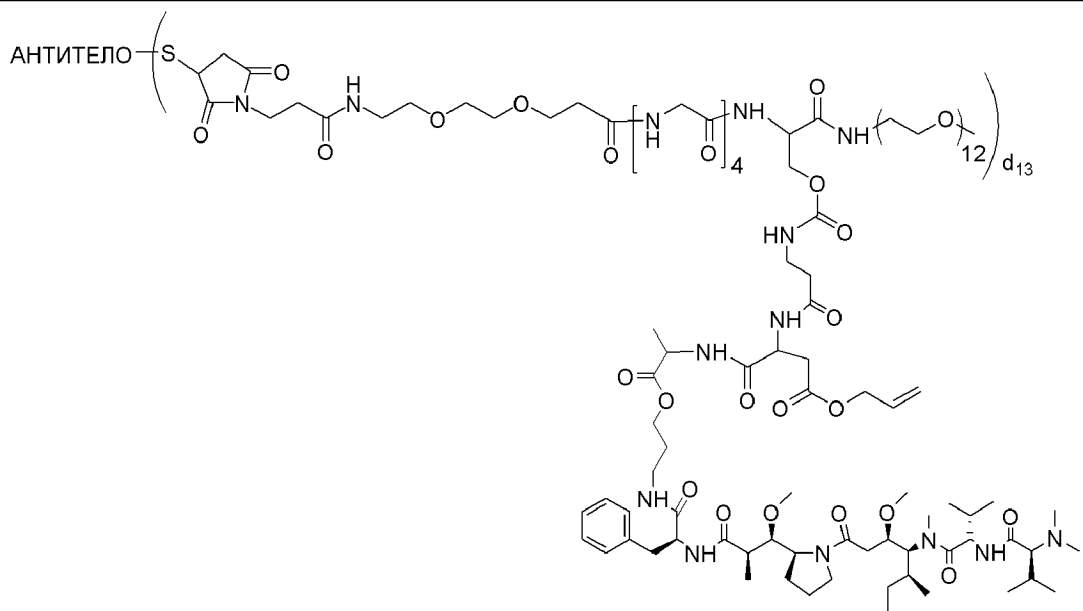


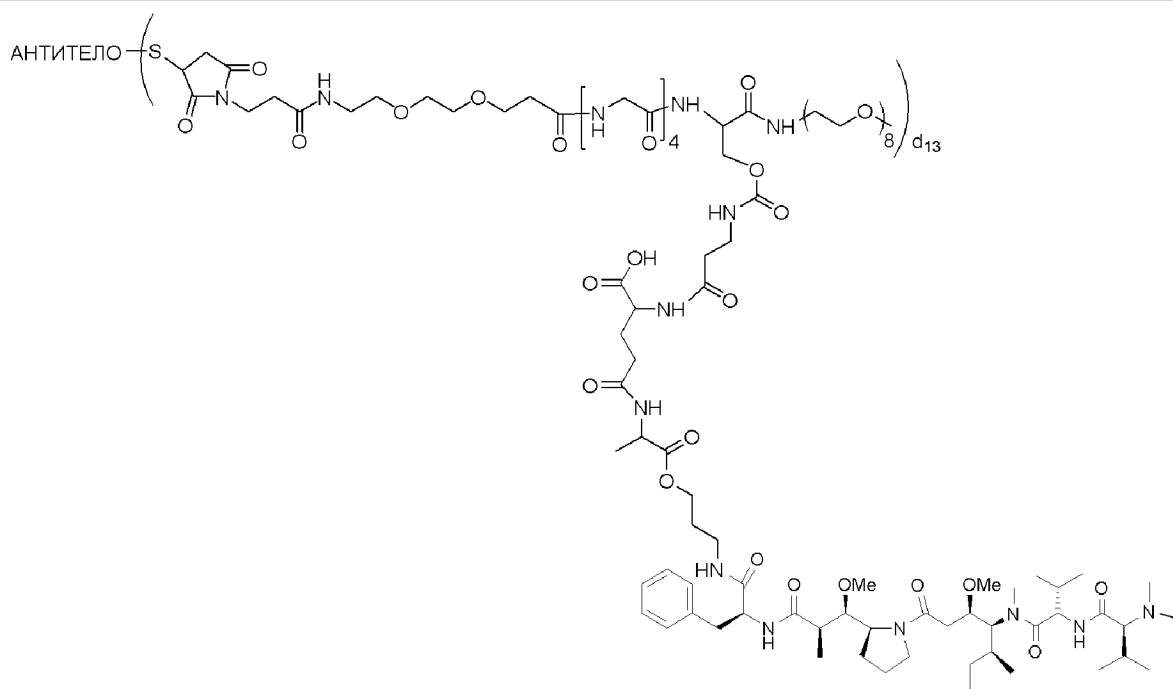
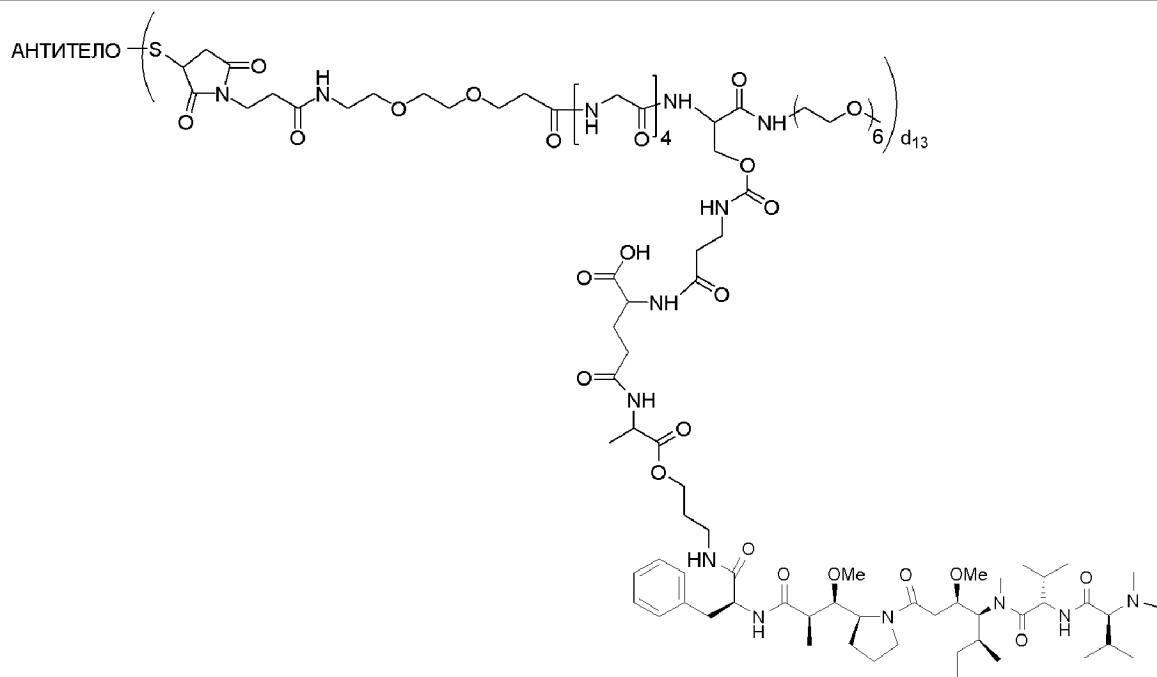
## Структура

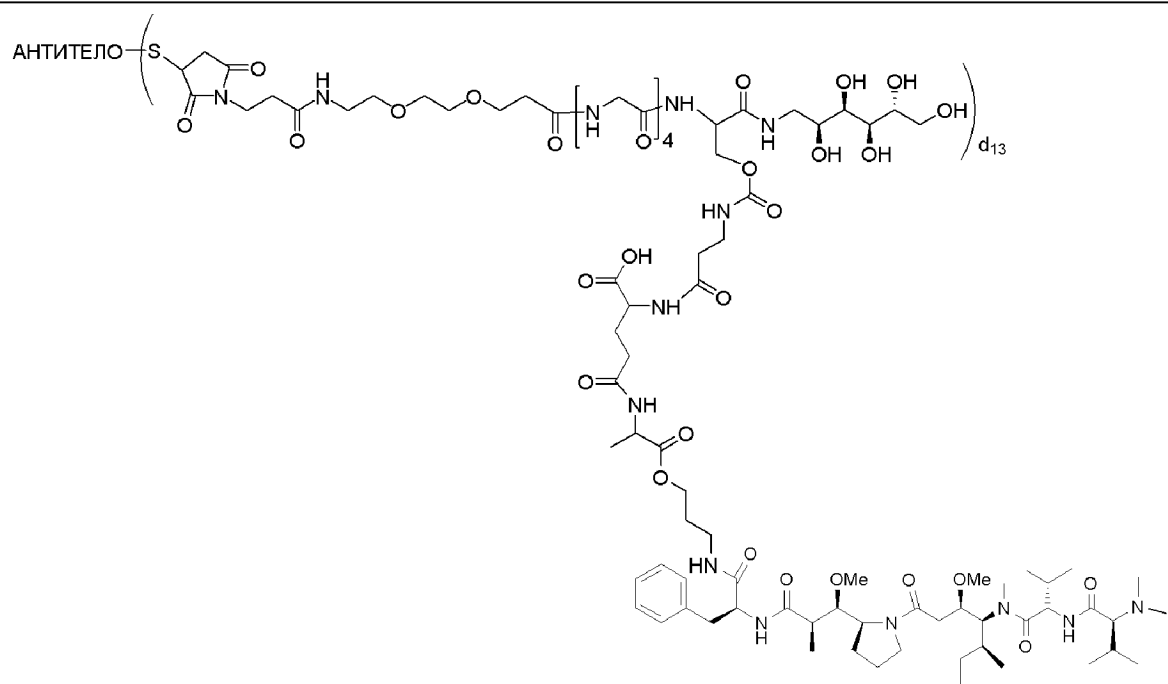


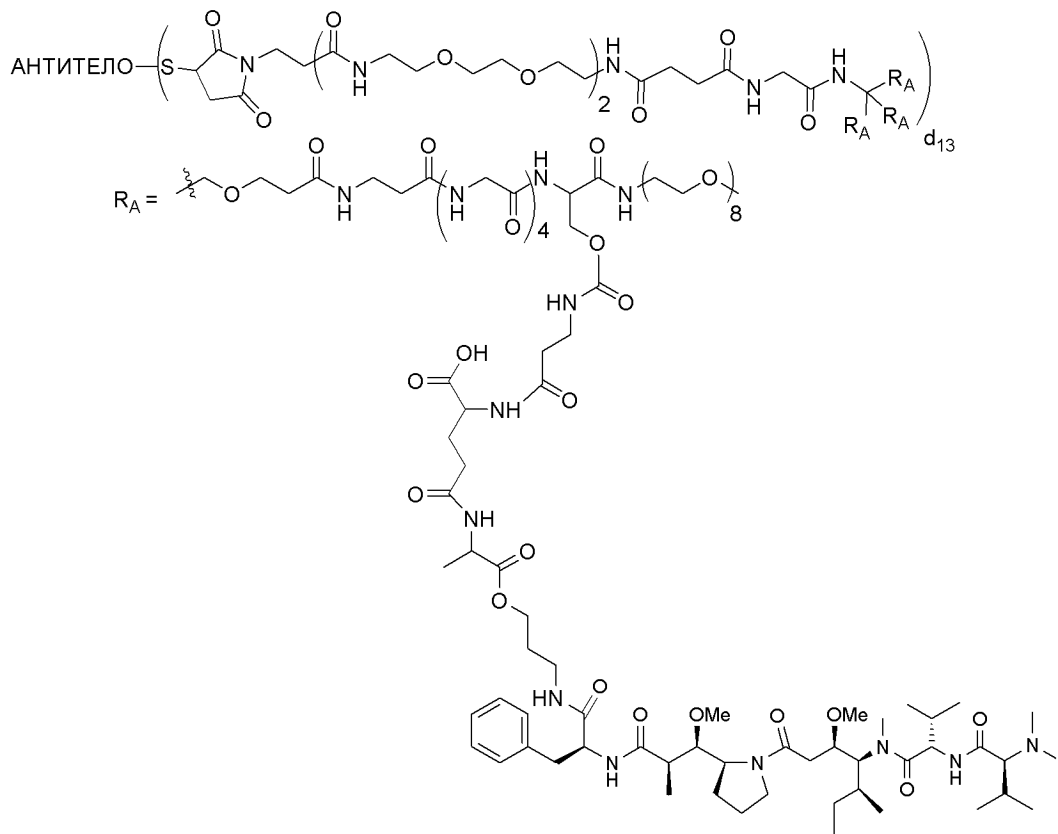


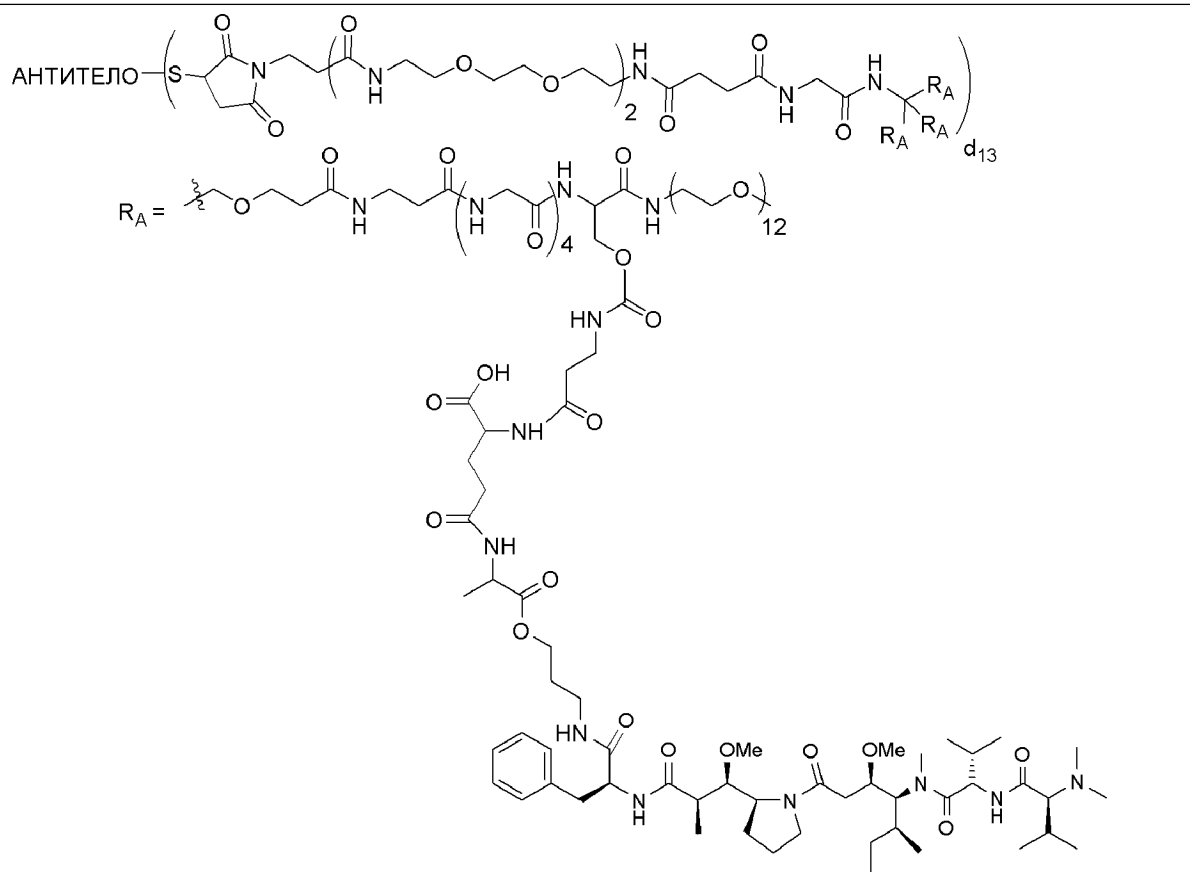


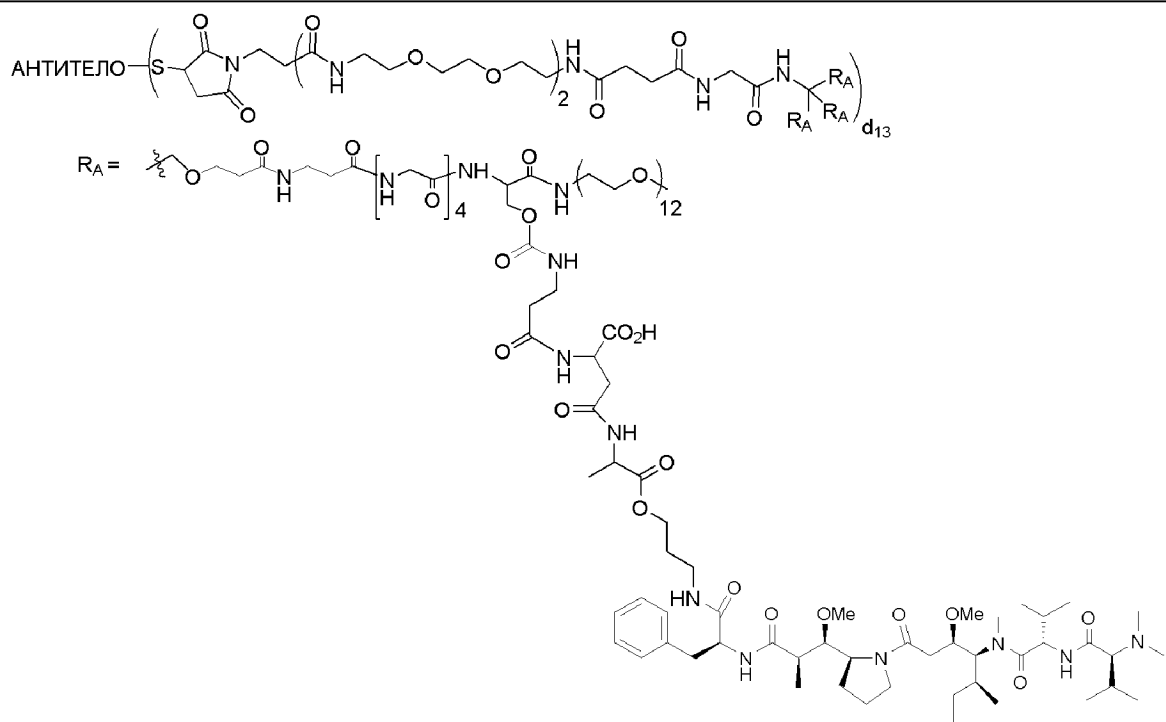


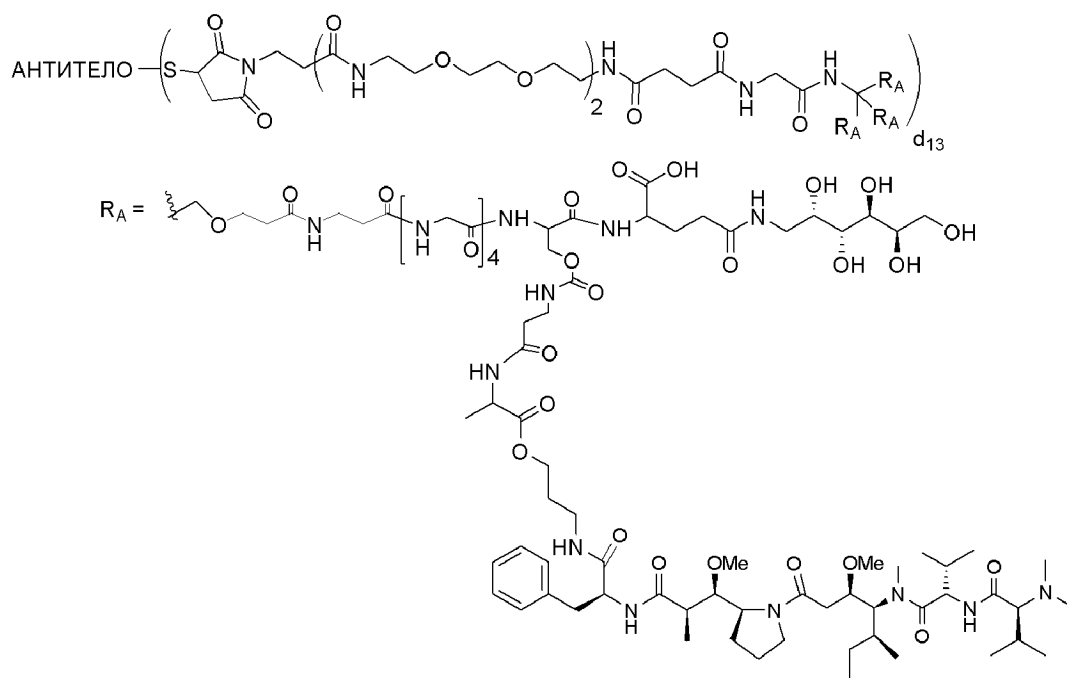


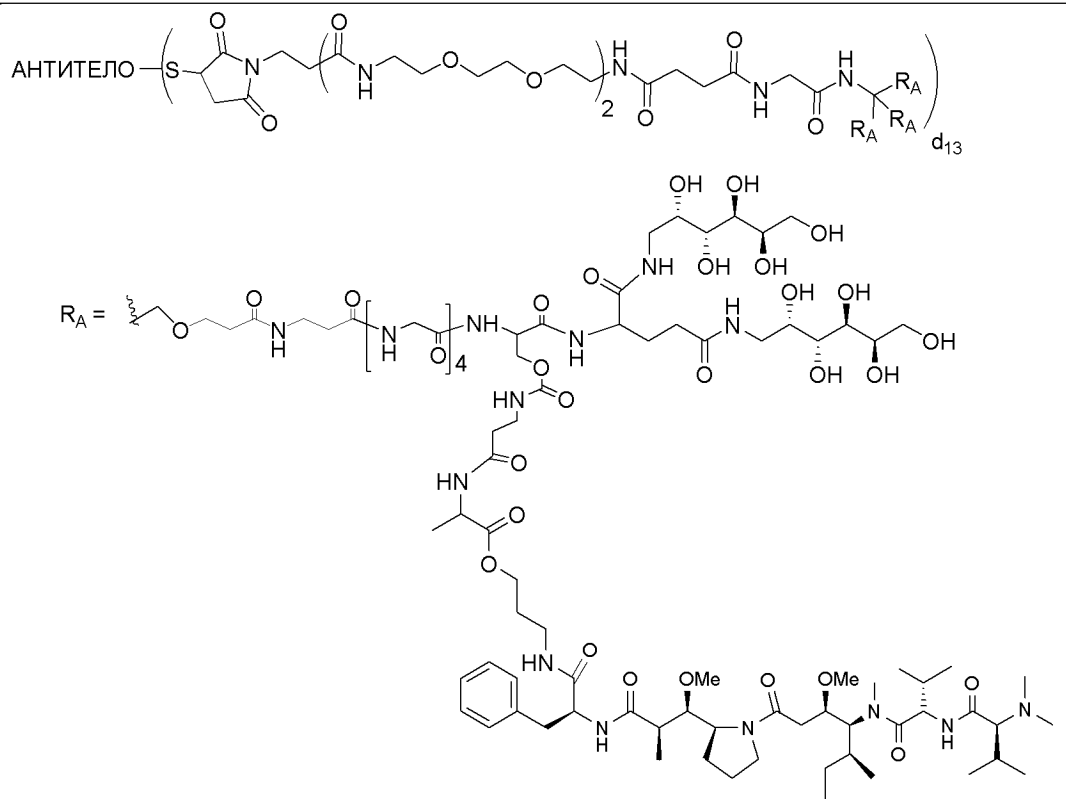




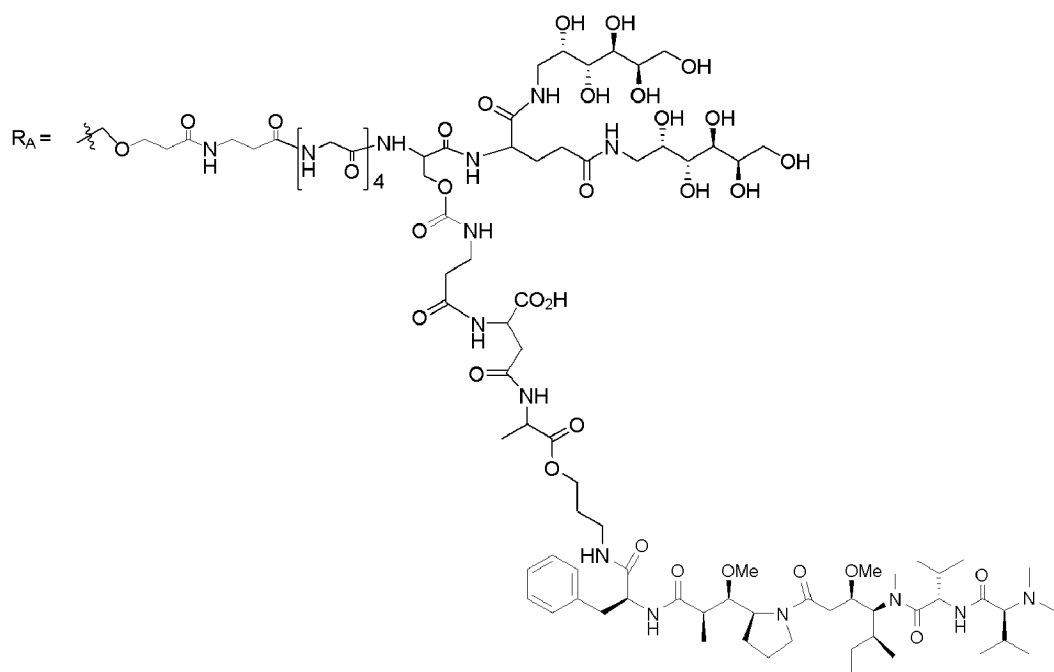
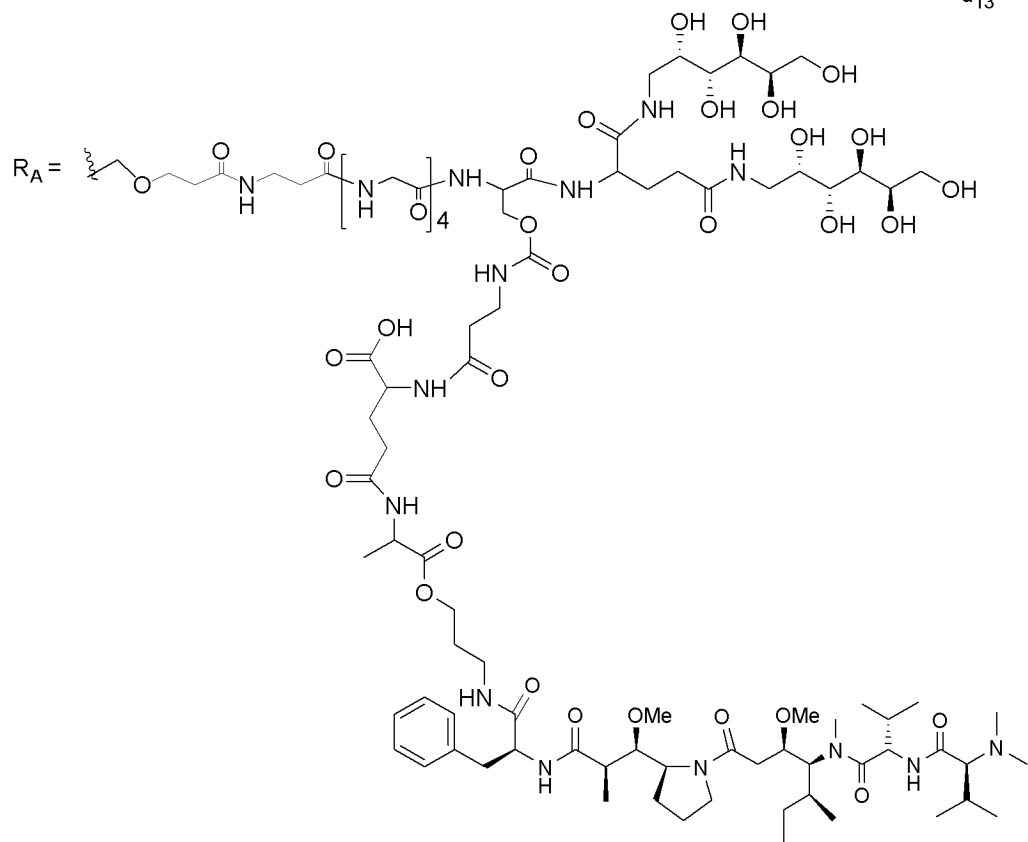








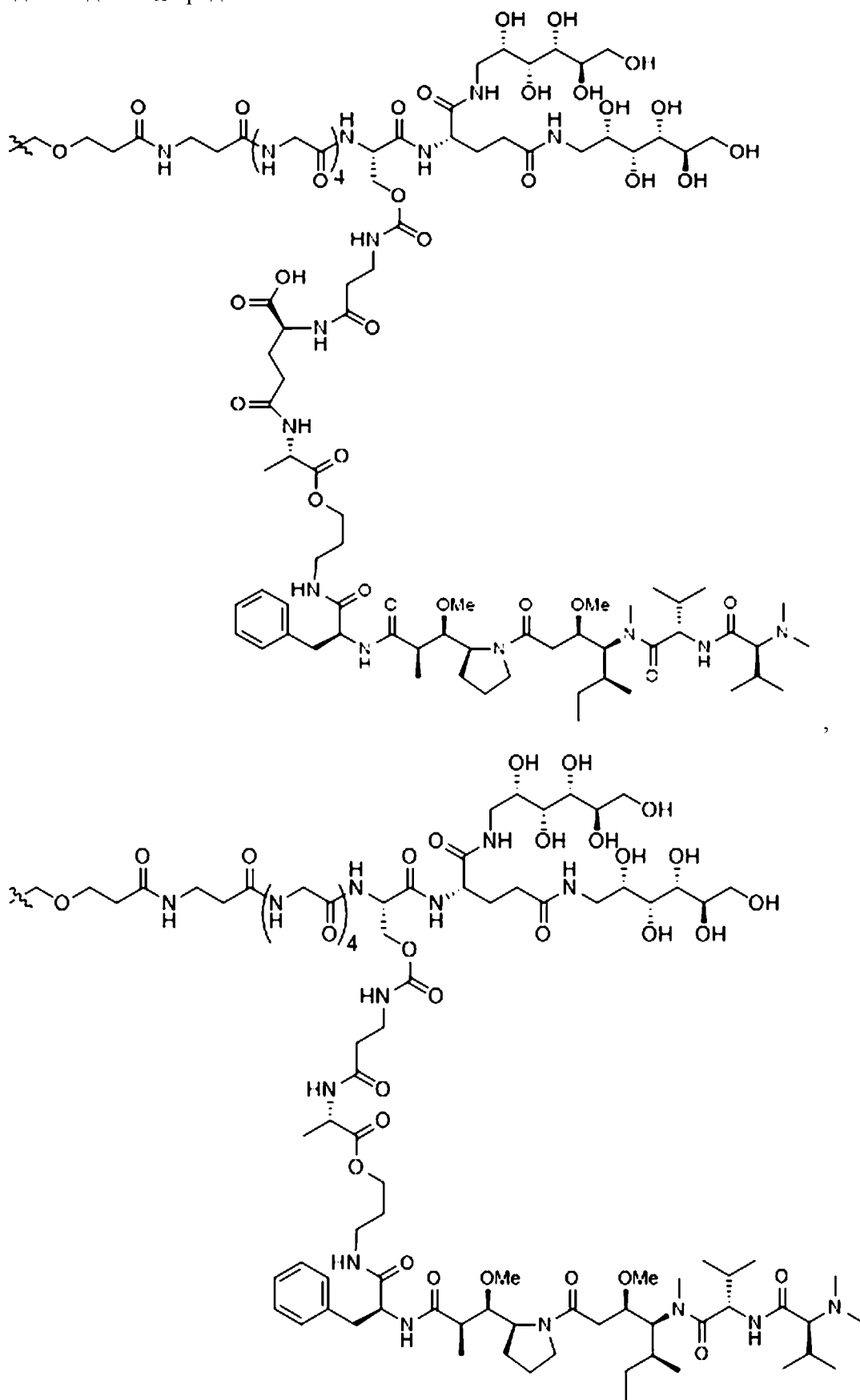


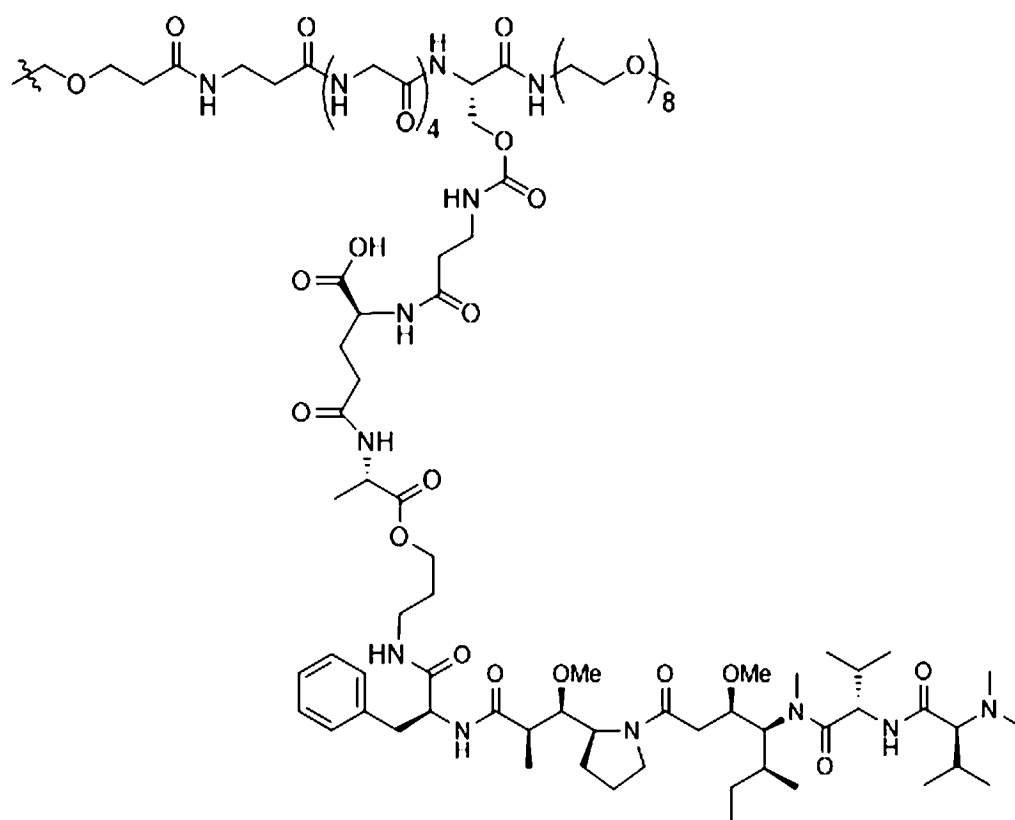


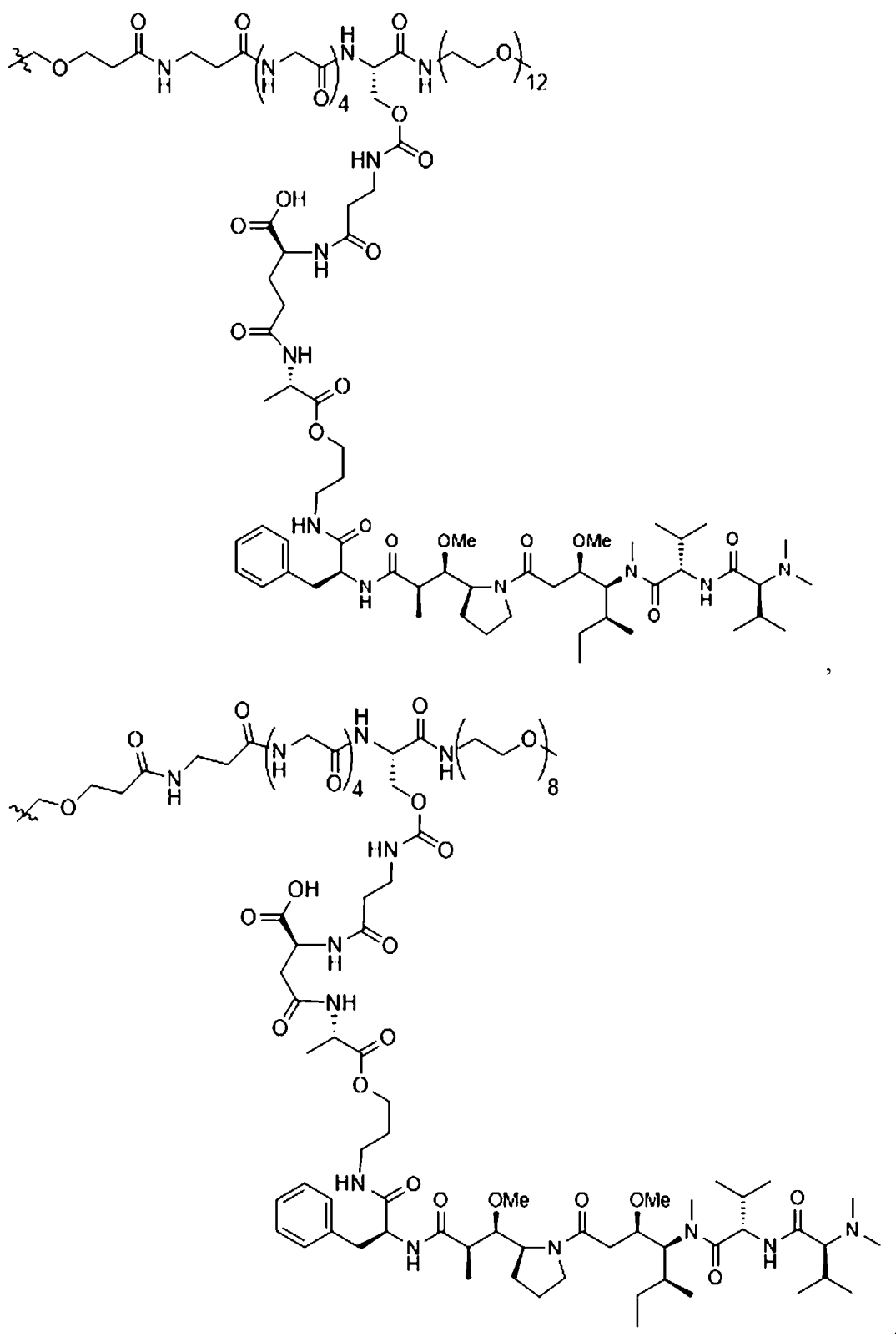


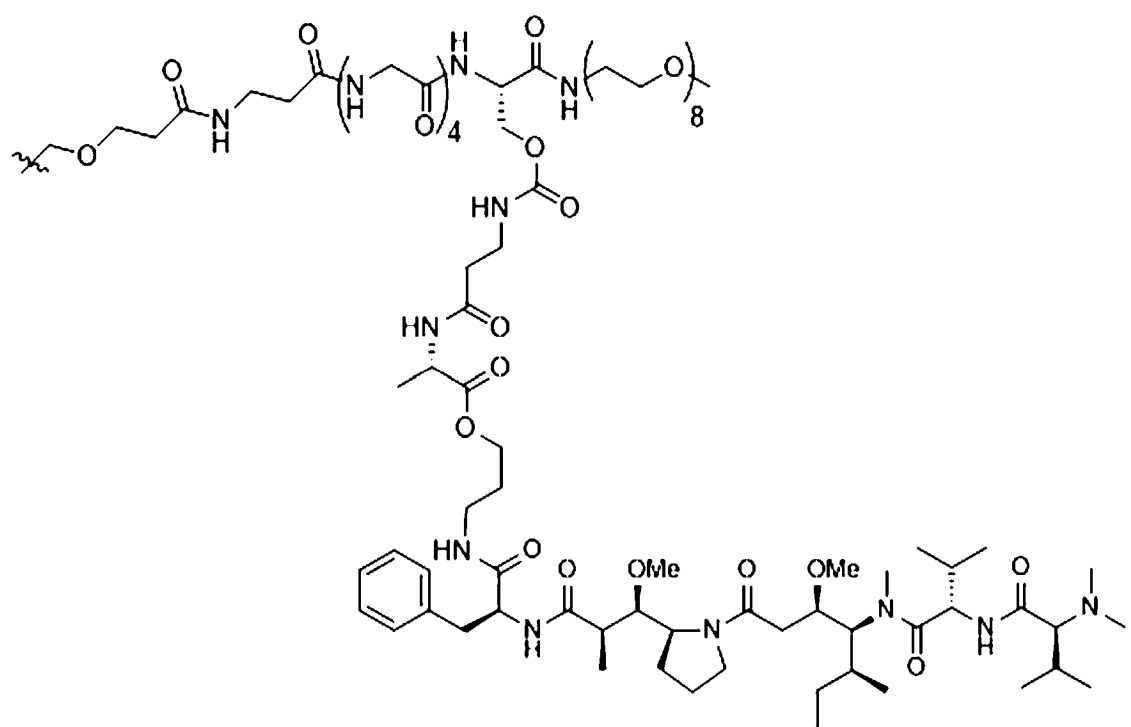
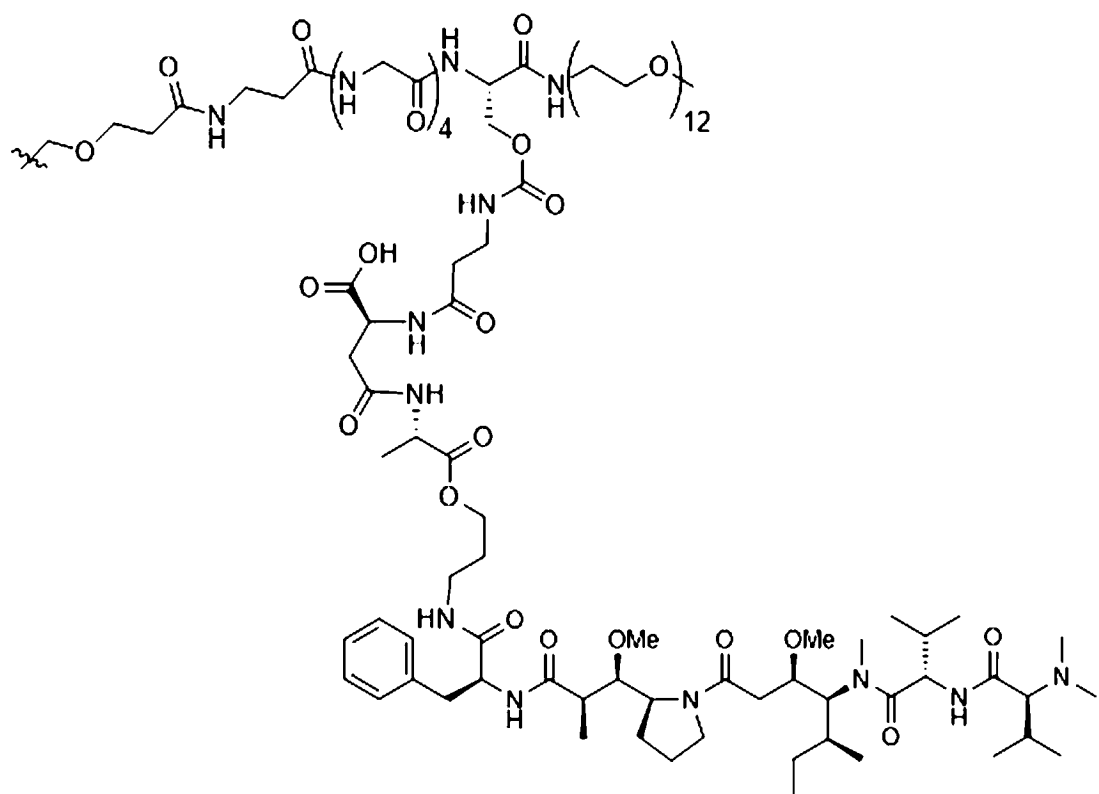
встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXX)]

где каждый  $R_A$  представляет собой

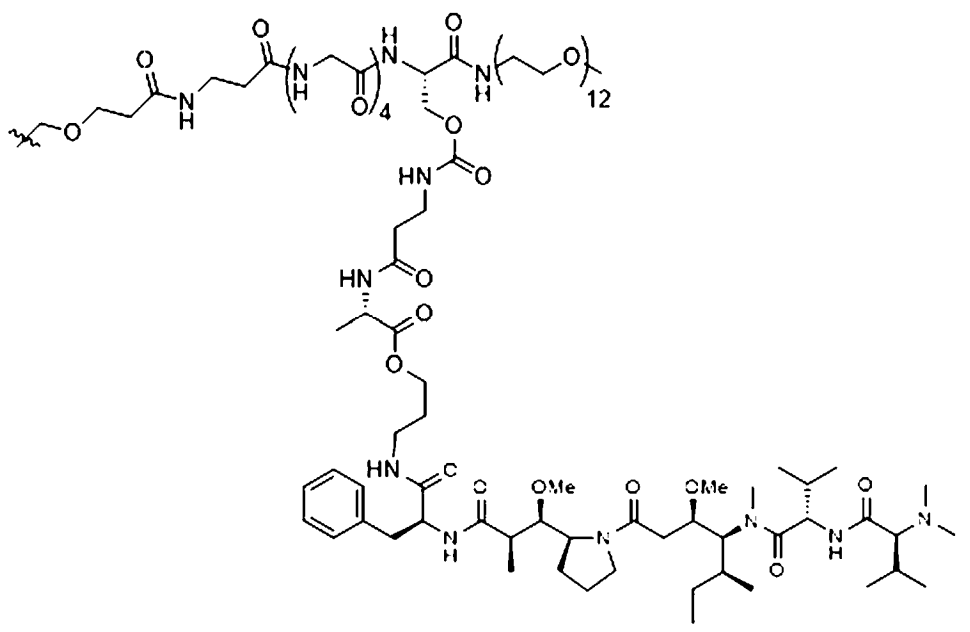








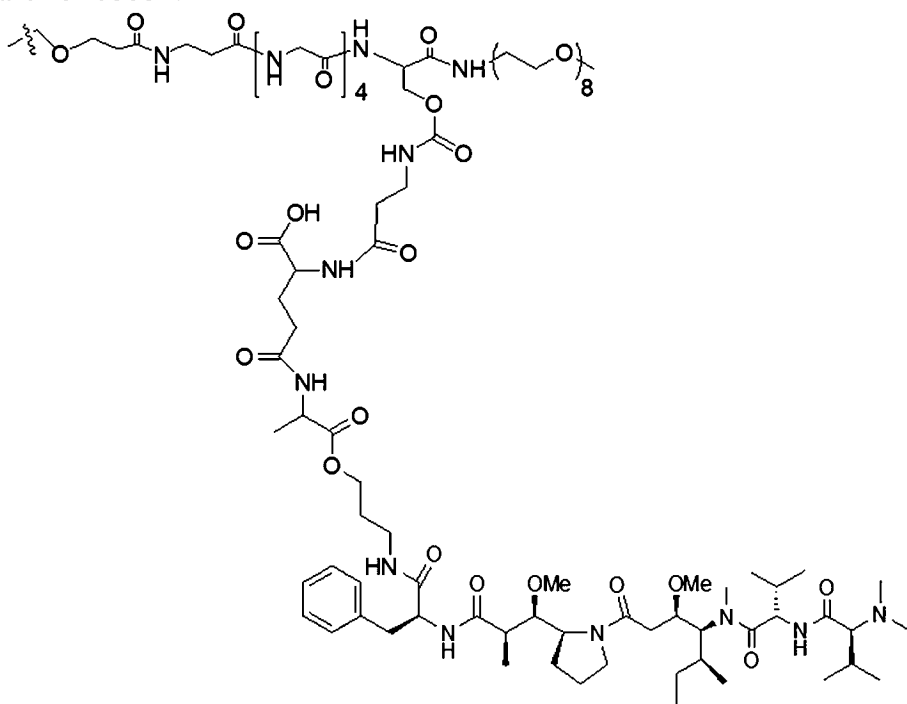
ИЛИ



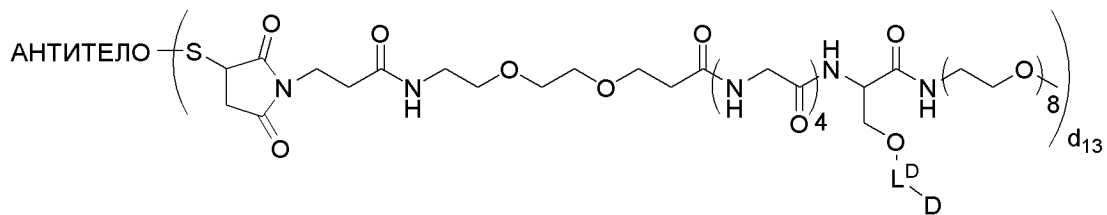
где

$d_{13}$  равен 2, 4, 6 или 8.

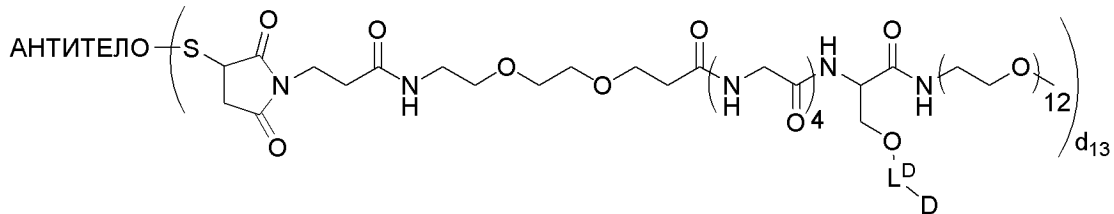
**[707]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXX), где каждый  $R_A$  представляет собой:



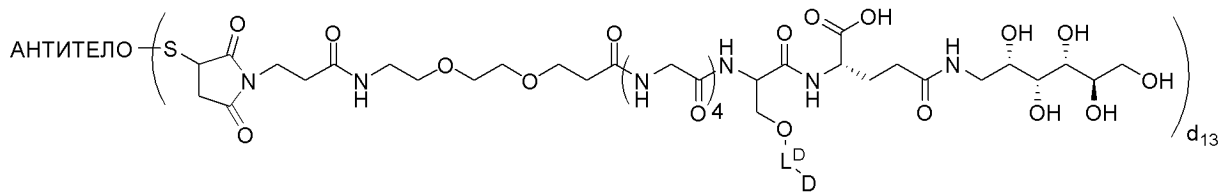
**[708]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXI-1), (XXXI-2), (XXXI-3) или (XXXI-4):



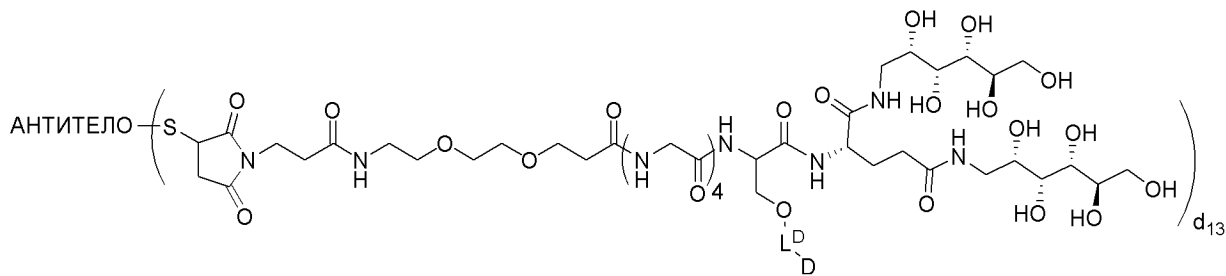
(XXXI-1),



(XXXI-2),



(XXXI-3), или



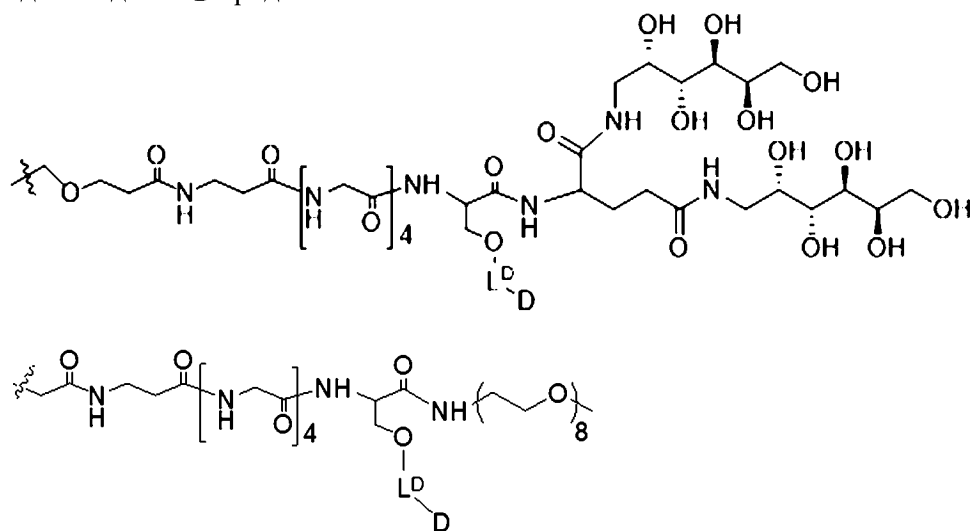
(XXXI-4).

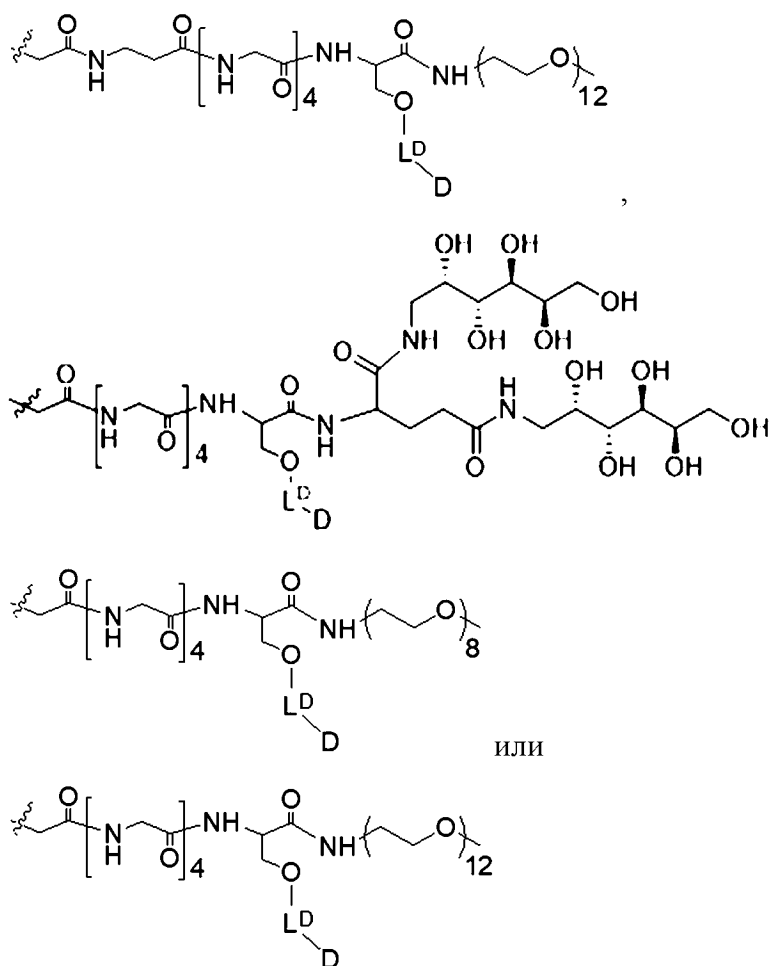
**[709]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXII):



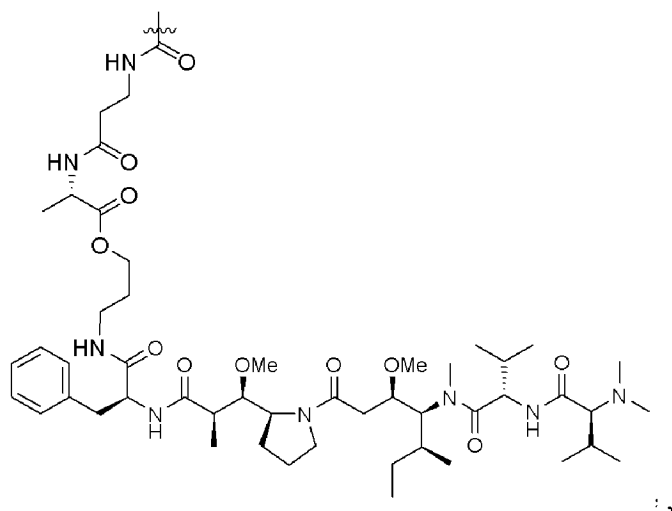
$$\text{АНТИТЕЛО} - \left( \text{S} - \begin{array}{c} \diagup \text{C} \diagdown \\ \diagdown \text{C} \diagup \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array} \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{R}_\text{B} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{R}_\text{B} \end{array} \right)_{\text{d}_{13}}$$

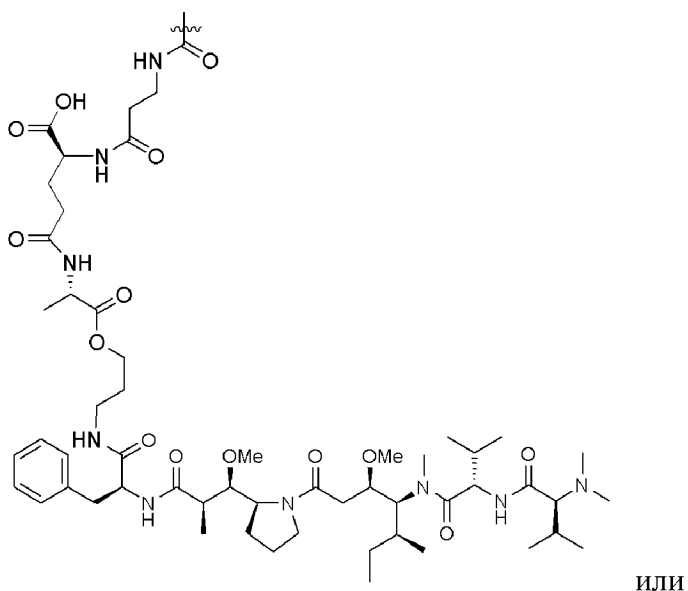
где каждый  $R_V$  представляет собой:



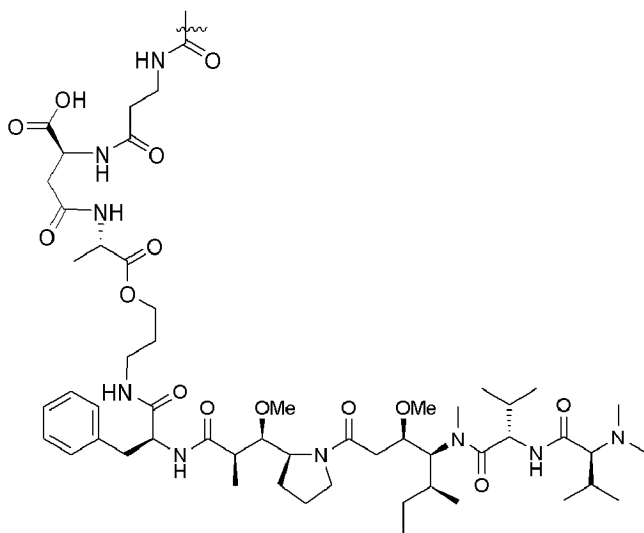


[711] В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXI-1), (XXXI-2), (XXXI-3), (XXXI-4) или (XXXII), в котором переменный  $-L^D-D$  представляет собой:

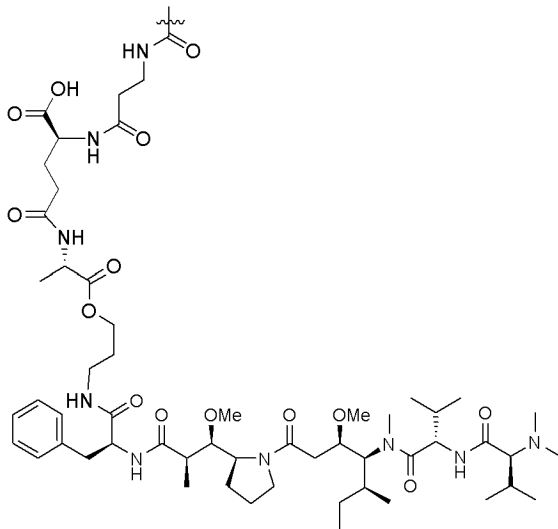




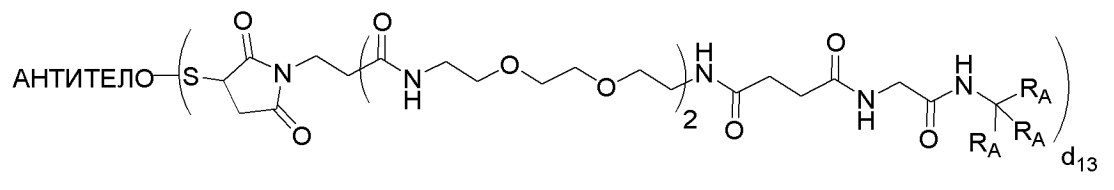
или



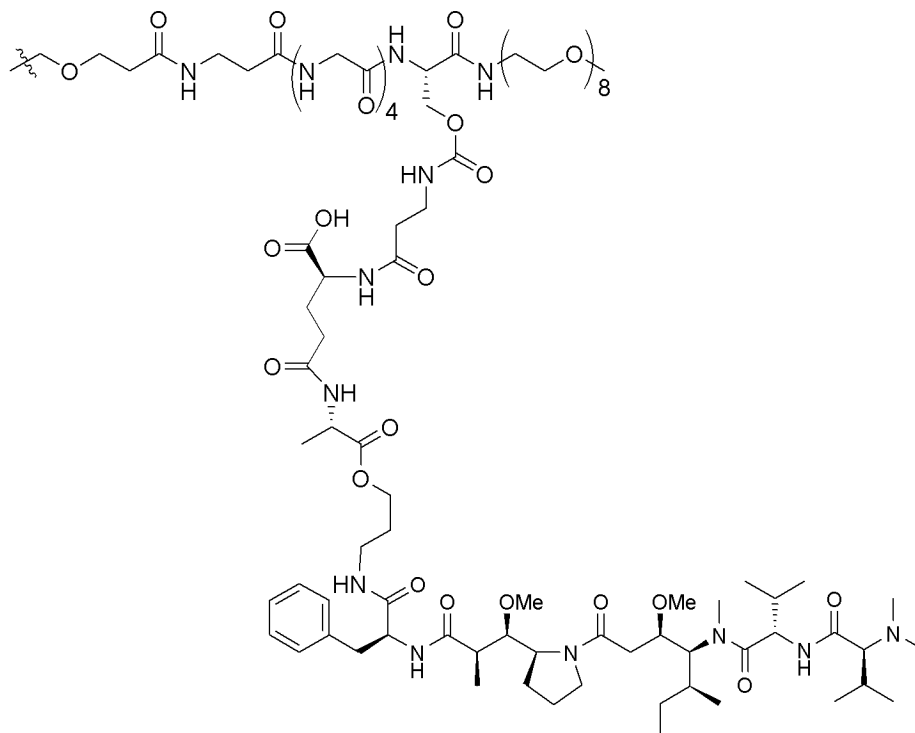
[712] В некоторых вариантах осуществления антитело против B7-H4 или антитело с встроенным цистеином против B7-H4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXI-1), (XXXI-2), (XXXI-3), (XXXI-4) или (XXXII), в котором переменный -L<sup>D</sup>-D представляет собой:



**[713]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXXIII-3):

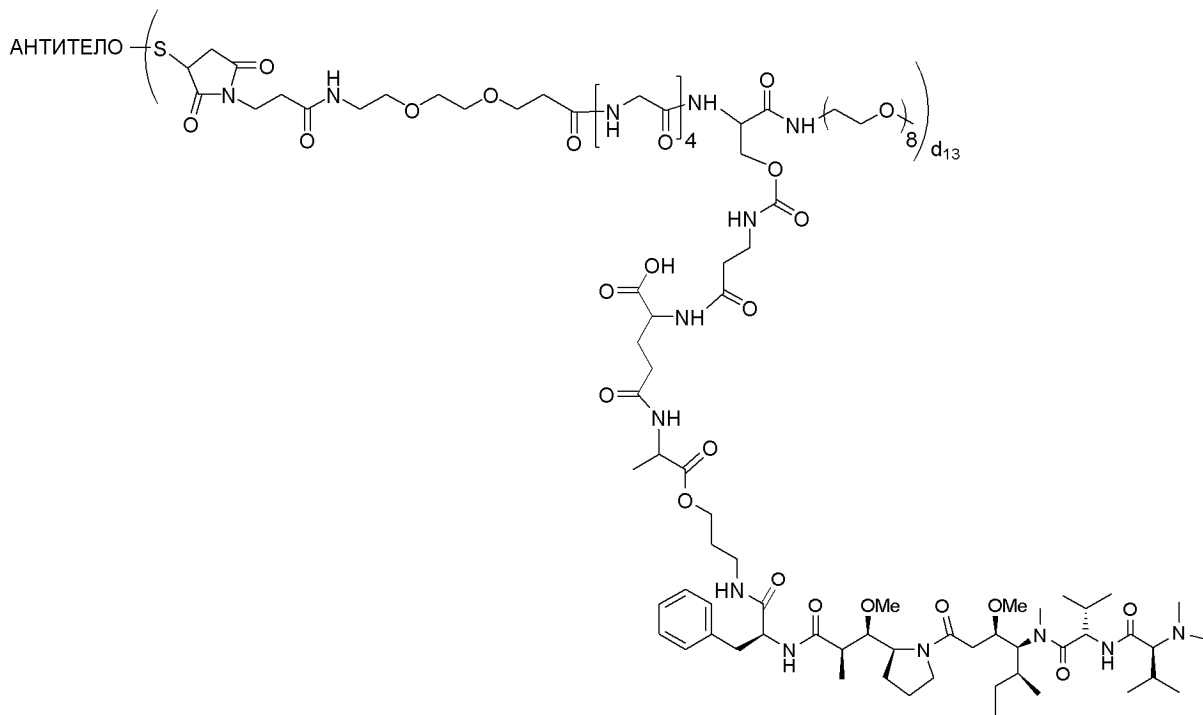


где каждый  $R_A$  представляет собой:



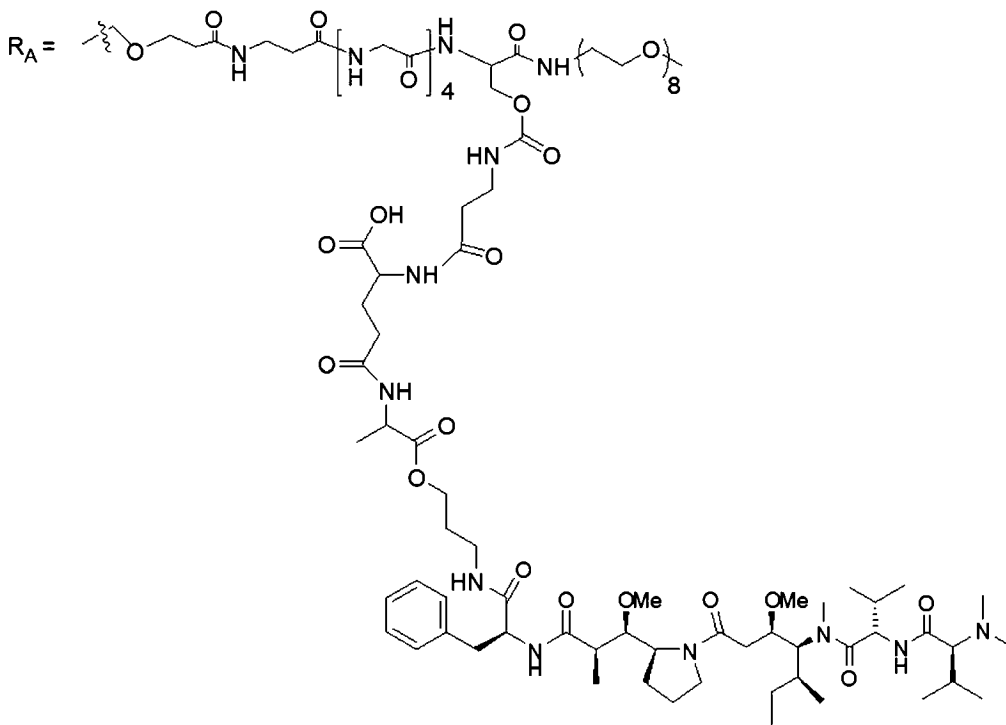
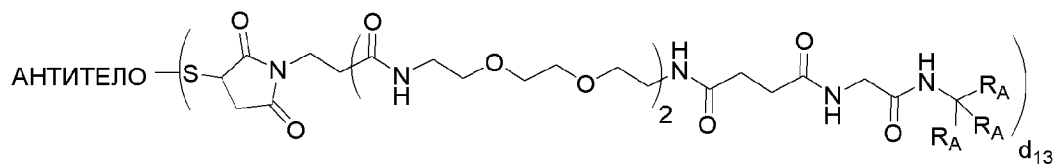
(XXXIII-3).

**[714]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXXIII-8):



(XXXIII-8).

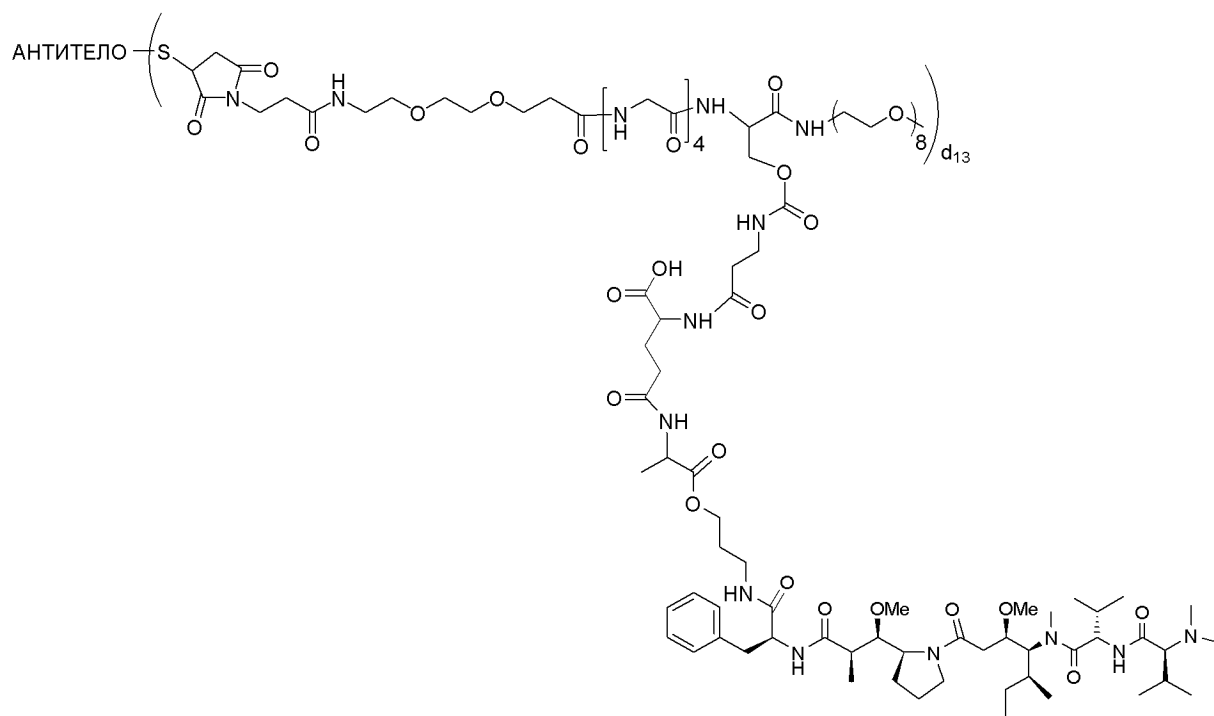
**[715]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXIII-5):



(XXXIII-5),

где  $d_{13}$  является таким, как определено в настоящем описании.

**[716]** В некоторых вариантах осуществления антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4, конъюгированное с частью цитотоксического лекарственного средства, представляет собой конъюгат формулы (XXXIII-8):



(XXXIII-8),

где  $d_{13}$  является таким, как определено в настоящем описании.

#### **Модифицированные конъюгаты антитело против В7-Н4-лекарственное средство**

**[717]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство по настоящему изобретению могут быть получены путем реакции модифицированного антитела против В7-Н4 по настоящему изобретению с частью линкер-лекарственное средство, содержащей функциональную группу (например,  $W^P$ ), которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой  $A''$  части модифицированного GlcNAc,  $* - \text{GlcNAc} - S'' - A''$ , в модифицированном антителе против В7-Н4.

**[718]** В некоторых вариантах осуществления  $W^P$  содержит алкинил, например, циклоалкинил, гетероциклоалкинил или концевой алкинил.

**[719]** В некоторых вариантах осуществления функциональная группа  $A''$  модифицированного антитела против В7-Н4 представляет собой азидо, кето или алкинил. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа  $A''$  модифицированного антитела против В7-Н4 представляет собой азидо. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа азидо  $A''$  модифицированного антитела против В7-Н4 реагирует с алкинилом  $W^P$  (например, циклоалкинил, гетероциклоалкинил или концевой алкинил)

части линкер-лекарственное средство с образованием части триазола (например, посредством реакции циклоприсоединения). Реакция циклоприсоединения группы азидо и алкинильной группы известна в данной области как "клик-химия".

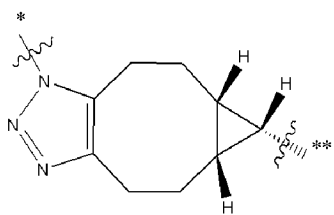
[720] В некоторых вариантах осуществления  $W^P$  части линкер-лекарственное средство содержит концевой алкинил, и реакцию циклоприсоединения можно проводить в присутствии катализатора (например, катализатора Cu(I)).

[721] В некоторых вариантах осуществления  $W^P$  части линкер-лекарственное средство содержит циклоалкинил или гетероциклоалкинил (например, напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил).

[722] В некоторых вариантах осуществления  $W^P$  части линкер-лекарственное средство содержит напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил, и реакцию циклоприсоединения можно проводить в присутствии или в отсутствии катализатора. В некоторых вариантах осуществления реакция циклоприсоединения может происходить спонтанно посредством реакции, называемой облегченным напряжением азид-алкиновым циклоприсоединением (SPAAC), которая известна в данной области в качестве "безметалловой клик-химии". В некоторых вариантах осуществления напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил является такими, как описано в настоящем описании.

[723] В некоторых вариантах осуществления при конъюгации функциональная группа A" модифицированного антитела против B7-H4 и  $W^P$  части линкер-лекарственное средство образует часть триазола.

[724] В некоторых вариантах осуществления при конъюгации функциональная группа A" модифицированного антитела против B7-H4 и  $W^P$  части линкер-лекарственное средство образует часть триазола формулы (XXXV):



(XXXV), где \* обозначает прямое или не прямое присоединение к остальной части модифицированного антитела против B7-H4; и \*\* указывает на присоединение к  $M^P$ , когда он присутствует, или к  $L^M$  или  $M^A$ .

[725] В некоторых вариантах осуществления, когда азид-модифицированное антитело против B7-H4 по настоящему изобретению подвергают реакции с частью линкер-лекарственное средство, содержащей алкинильную группу, с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство посредством реакции циклоприсоединения, образовавшаяся часть триазола в конъюгате антитело-лекарственное средство может быть устойчивой к гидролизу и/или другим путям деградации.

[726] В некоторых вариантах осуществления, когда альдегид- или кетон-модифицированное антитело против B7-H4 по настоящему изобретению подвергают

реакции с частью линкер-лекарственное средство, содержащей гидроксилламин или гидразин, полученная часть оксима или гидразона в модифицированном конъюгате антитело против В7-Н4-лекарственное средство может быть относительно инертной в нейтральных условиях.

[727] В некоторых вариантах осуществления модифицированный конъюгат В7-Н4 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может иметь высокую стабильность.

[728] В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4 и модифицированный конъюгат антитело против В7-Н4-лекарственное средство по настоящему изобретению могут быть синтезированы посредством практических путей синтеза, поскольку процесс внесения функциональной группы А" (например, азида, кето или алкинил) в антитело является простым и общеприменимым.

[729] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический конъюгат антитело против В7-Н4-лекарственное средство по настоящему изобретению получают посредством процесса, включающего реакцию модифицированного антитела против В7-Н4 с частью линкер-лекарственное средство, где:

часть линкер-лекарственное средство содержит циклоалкинил или гетероциклоалкинил,

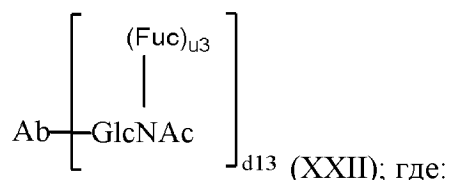
модифицированное антитело против В7-Н4 перед конъюгацией включает антитело против В7-Н4 и модифицированную часть  $\text{GlcNAc}^* - \text{GlcNAc} - \text{S}'' - \text{A}''$ , присоединенную к антителу против В7-Н4 через положение C1 GlcNAc; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин; S'' представляет собой сахар или дериватизированный сахар; и A'' представляет собой азида.

[730] В некоторых вариантах осуществления A'' представляет собой циклоалкинил или гетероциклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления A'' представляет собой циклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления A'' представляет собой гетероциклоалкинил.

[731] В некоторых вариантах осуществления A'' представляет собой напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления A'' представляет собой напряженный циклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления A'' представляет собой напряженный гетероциклоалкинил.

[732] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический конъюгат антитело против В7-Н4-лекарственное средство по настоящему изобретению получают посредством процесса, включающего стадии:

(а) приведения в контакт промежуточного антитела формулы (XXII):





Ab представляет собой антитело против B7-H4; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин; Fuc представляет собой фукозу;  $u_3$  равен 0 или 1; и  $d_{13}$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12;

с соединением  $P''-S''-A''$ , где:

$S''$  представляет собой сахар или дериватизированный сахар;  $A''$  представляет собой азида; и  $P''$  представляет собой уридиндифосфат (UDP), гуанозиндифосфат (GDP) или цитидиндифосфат (CDP);

в присутствии галактозилтрансферазы, тем самым получая модифицированное антитело против B7-H4, содержащее часть модифицированного GlcNAc,  $*-GlcNAc-S''-A''$ , (необязательно, часть модифицированного GlcNAc присоединена к остальной части модифицированного антитела в положении C1 GlcNAc); и

(b) реакции модифицированного антитела против B7-H4 с частью линкер-лекарственное средство, содержащей напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил, тем самым получая конъюгат антитело-лекарственное средство.

[733] В некоторых вариантах осуществления процесс получения сайт-специфического конъюгата антитело против B7-H4-лекарственное средство является таким, как представлено на фиг.5.

[734] В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против B7-H4, содержащее азида на каждой аминокислоте N297 антитела, конъюгировано с частью линкер-лекарственное средство, содержащей напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил, посредством безметалловой клик-химии с образованием сайт-специфического конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

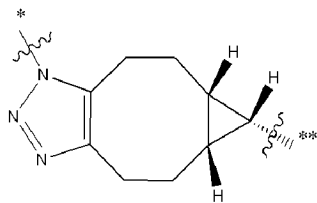
[735] В некоторых вариантах осуществления, когда модифицированное антитело против B7-H4 содержит по меньшей мере одну азидочасть и часть линкер-лекарственное средство содержит напряженный циклоалкинил, присутствие медного катализатора не является необходимым для реакции циклоприсоединения между азида в модифицированном антителе и напряженным циклоалкинилом или гетероциклоалкинилом части линкер-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления реакция циклоприсоединения протекает в отсутствие медного катализатора, который может устранять несколько возможных недостатков использования медного катализатора в процессе.

[736] В некоторых вариантах осуществления катализатор Cu(I), как правило, требуется для реакции циклоприсоединения между азидочастью антитела и концевой алкиновой частью. В некоторых вариантах осуществления для поиска оптимальных параметров для эффективного конвертирования может потребоваться обширная оптимизация и тонкая настройка условий. Тем не менее, даже в таких условиях сопутствующее образование активных форм кислорода не всегда может быть полностью предотвращено, что в свою очередь может индуцировать окислительное повреждение антитела/белка (например, окисление метионина, гистидина, цистеина или дисульфидных

связей). В других протоколах используются источники Cu(I), такие CuBr, для мечения фиксированных клеток и синтеза гликопротеинов. В этих случаях нестабильность Cu(I) в воздухе приводит к потребности в больших избытках Cu (например, более 4 мм) и лиганда для эффективных реакций, что может также привести к риску повреждения или преципитации антитела/белка, а также к присутствию остаточного металла после очистки. Таким образом, конъюгация азидо-содержащего антитела с концевым алкином в присутствии медного катализатора может приводить к обширному образованию побочных продуктов вследствие нежелательного окисления аминокислот.

[737] В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против B7-H4, содержащее азидо (например, на каждой аминокислоте N297 антитела), конъюгировано с частью линкер-лекарственное средство, содержащей напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил (например, посредством безметалловой клик-химии).

[738] В некоторых вариантах осуществления при конъюгации азидо-часть модифицированного антитела против B7-H4 и напряженного циклоалкинила или гетероциклоалкинила части линкер-лекарственное средство образует часть триазола формулы (XXXV):



(XXXV), где \* обозначает прямое или не прямое присоединение к остальной части модифицированного антитела и \*\* указывает на присоединение к  $M^P$ , когда он присутствует, или к  $L^M$  или  $M^A$ .

[739] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело против B7-H4-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит один или несколько D, где каждый D независимо представляет собой терапевтическое средство (например, часть цитотоксического лекарственного средства), где один или несколько D могут быть одинаковыми или могут различаться.

[740] В некоторых вариантах осуществления один или несколько конкретных участков антитела против B7-H4 соединены с частью линкер-лекарственное средство, где части линкер-лекарственное средство, присоединенные к одному или нескольким конкретным участкам, могут быть одинаковыми или могут различаться. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько частей линкер-лекарственное средство, которые содержат один или несколько D (т.е. часть цитотоксического лекарственного средства), присоединены к одному антителу против B7-H4.

[741] В некоторых вариантах осуществления D представляет собой часть цитотоксического лекарственного средства, где часть цитотоксического лекарственного средства представляет собой (a) соединение ауристатина; (b) соединение калихеамицина; (c) соединение дуокармицина; (d) SN38, (e) пирролобензодиазепин; (f) соединение

барвинка; (g) соединение тубулизина; (h) неприродное соединение камптотецина; (i) соединение майтанзиноида; (j) ДНК-связывающее лекарственное средство; (k) ингибитор киназы; (l) ингибитор MEK; (m) ингибитор KSP; (n) ингибитор топоизомеразы; (o) ДНК-алкилирующее лекарственное средство; (p) РНК-полимеразу; (q) ингибитор PARP; (r) ингибитор NAMPT; (s) ингибитор топоизомеразы; (t) ингибитор синтеза белков; (u) ДНК-связывающее лекарственное средство; (v) ДНК-интеркалирующее лекарственное средство или (w) иммуномодулирующее соединение.

[742] В некоторых вариантах осуществления D, часть цитотоксического лекарственного средства, представляет собой (a) соединение ауристатина; (b) соединение калихеамицина; (c) соединение дуокармицина; (d) соединение камптотецина, (e) соединение пирролобензодиазепина; (f) соединение барвинка или их аналог.

[743] В некоторых вариантах осуществления соединение ауристатина представляет собой ауристатин, доластатин, монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF), ауристатин F, AF-HPA, MMAF-HPA или фенилендиамин (AFP).

[744] В некоторых вариантах осуществления дуокармицин или его аналог представляет собой дуокармицин A, дуокармицин B1, дуокармицин B2, дуокармицин C1, дуокармицин C2, дуокармицин D, дуокармицин SA, CC-1065, адозелезин, бизелезин или карзелезин.

[745] В некоторых вариантах осуществления соединение камптотецина представляет собой камптотецин, CPT-11 (иринотекан), SN-38 или топотекан.

[746] В некоторых вариантах осуществления соединение пирролобензодиазепина представляет собой мономер пирролобензодиазепина, симметричный димер пирролобензодиазепина или несимметричный димер пирролобензодиазепина.

[747] В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против B7-H4 является модифицированным на аминокислоте N297.

[748] В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против B7-H4 (или общее количество точек присоединения), составляет 12 или менее. В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против B7-H4 (или общее количество точек присоединения), составляет 10 или менее. В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против B7-H4 (или общее количество точек присоединения), составляет 8 или менее. В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против B7-H4 (или общее количество точек присоединения), составляет 6 или менее. В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против B7-H4 (или общее количество точек присоединения), составляет 4 или

менее. В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 2 или менее.

[749] В некоторых вариантах осуществления общее количество специфических связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), равно 2.

[750] В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело против В7-Н4, линкер или терапевтическое средство, описанное в настоящем описании, могут быть собраны в конъюгат или каркас по настоящему изобретению в соответствии с различными технологиями и способами, известными в данной области. Конъюгат по настоящему изобретению и способ получения конъюгата описаны в настоящем описании (например, в качестве неограничивающих вариантов осуществления и примеров).

[751] В некоторых вариантах осуществления общее количество связей, образованных между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 (или общее количество точек присоединения), составляет 12 или менее.

[752] В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет более 1:1 и менее или ровно 12:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 12:1, приблизительно 11:1, приблизительно 10:1, приблизительно 9:1, приблизительно 8:1, приблизительно 7:1, приблизительно 6:1, приблизительно 5:1, приблизительно 4:1, приблизительно 3:1, приблизительно 2:1 или приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет от 2:1 до 10:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 10:1, приблизительно 9:1, приблизительно 8:1, приблизительно 7:1, приблизительно 6:1, приблизительно 5:1, приблизительно 4:1, приблизительно 3:1 или приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет от приблизительно 2:1 до приблизительно 4:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 4:1, приблизительно 3:1 или приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 2:1 или 1:1.

[753] В некоторых вариантах осуществления  $a_2$  равен 3, соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет



между терапевтическим средством (D) и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 1:1.

[755] В некоторых вариантах осуществления соотношение между частью линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом против В7-Н4 составляет приблизительно 2:1.

[756] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит группу аспарагина в области 290-305 (например, на N297), присоединенную к части производного сахара, которая содержит функциональную группу А"; и модифицированное антитело против В7-Н4 конъюгировано с частью линкер-лекарственное средство посредством ковалентной связи, образованной между А" и функциональной группой части линкер-лекарственное средство.

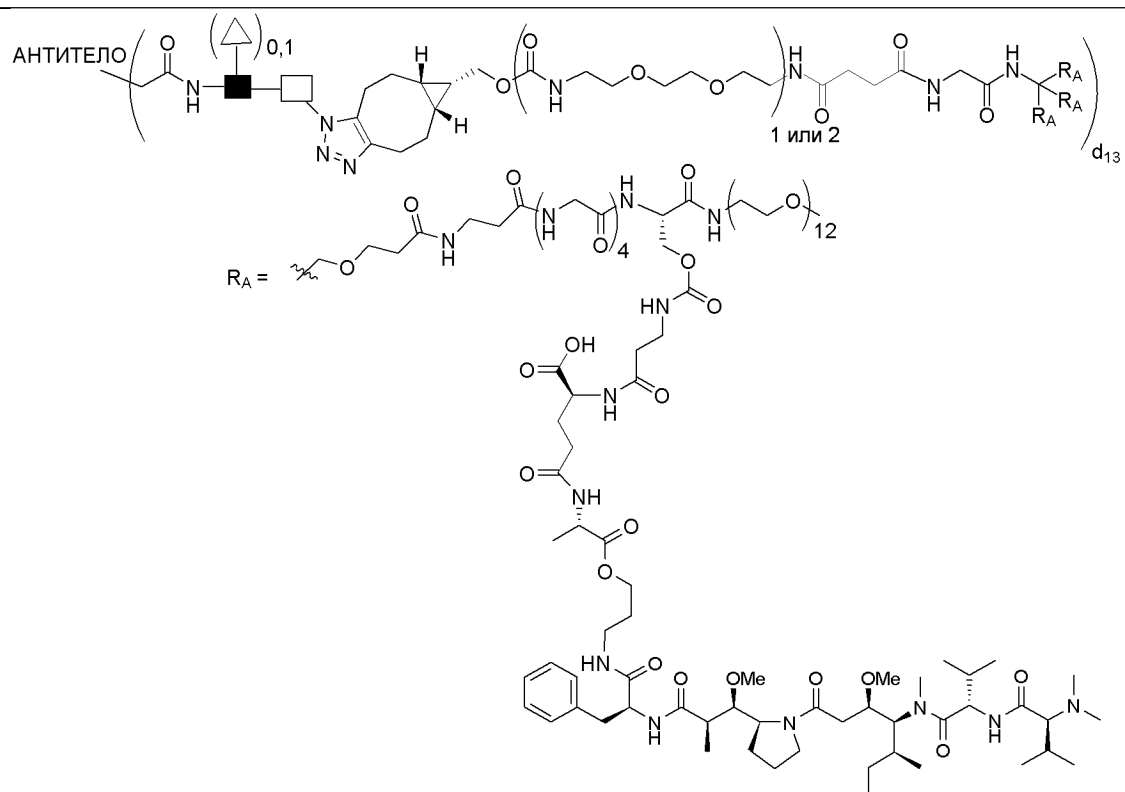
[757] В некоторых вариантах осуществления часть линкер-лекарственное средство содержит по меньшей мере две функциональных группы, каждая из которых способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой А" части производного сахара в модифицированном антителе против В7-Н4 (например, на аминокислоте N297 антитела) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство.

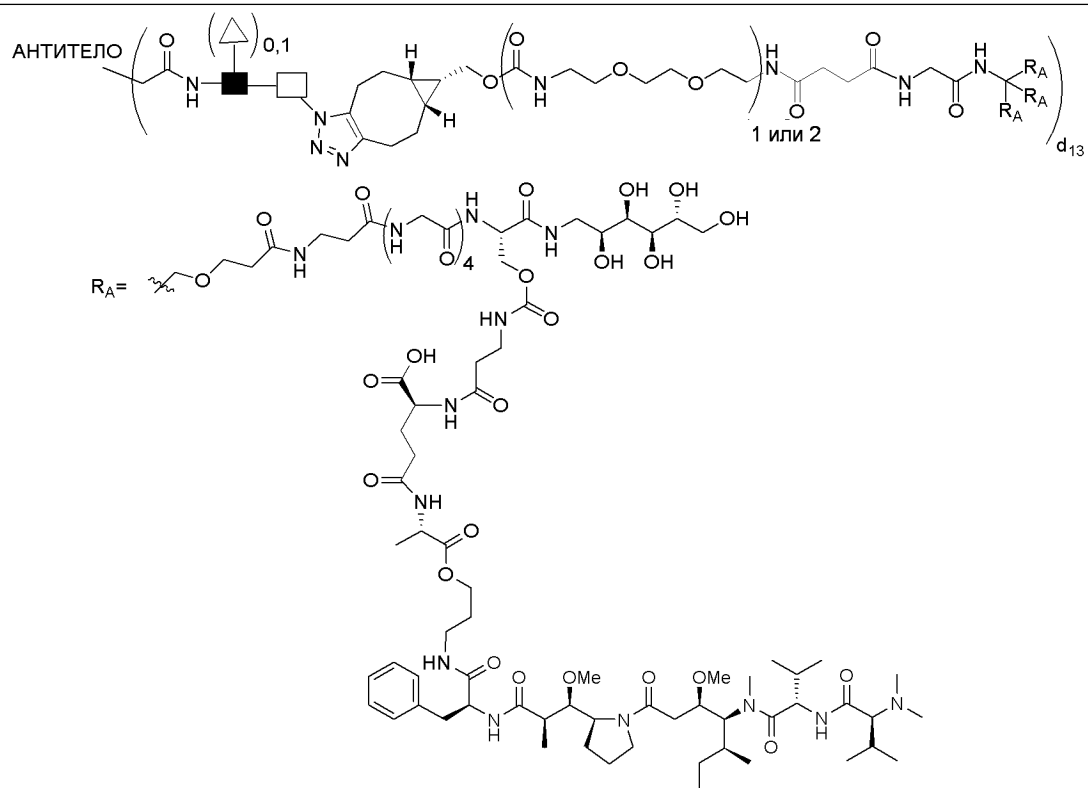
[758] В некоторых вариантах осуществления соотношение между модифицированным антителом против В7-Н4 и частью линкер-лекарственное средство составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2.

[759] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство и каркас по настоящему изобретению могут быть очищены (например, для удаления каких-либо исходных материалов) посредством экстенсивной диафильтрации. При необходимости можно проводить дополнительную очистку посредством эксклюзионной хроматографии для удаления каких-либо агрегированных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления очищенный конъюгат или каркас содержит менее чем приблизительно 5% масс./масс. (например, <2% масс./масс.) агрегированных конъюгатов при определении посредством SEC; менее чем 0,5% масс./масс. (например, <0,1% масс./масс.) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства при определении посредством ОФ-ВЭЖХ; менее чем 1% масс./масс. несущих лекарственное средство содержащих пептид каркасов при определении посредством SEC; и/или менее чем 2% масс./масс. (например, <1% масс./масс.) неконъюгированных антител при определении посредством НИС-ВЭЖХ.

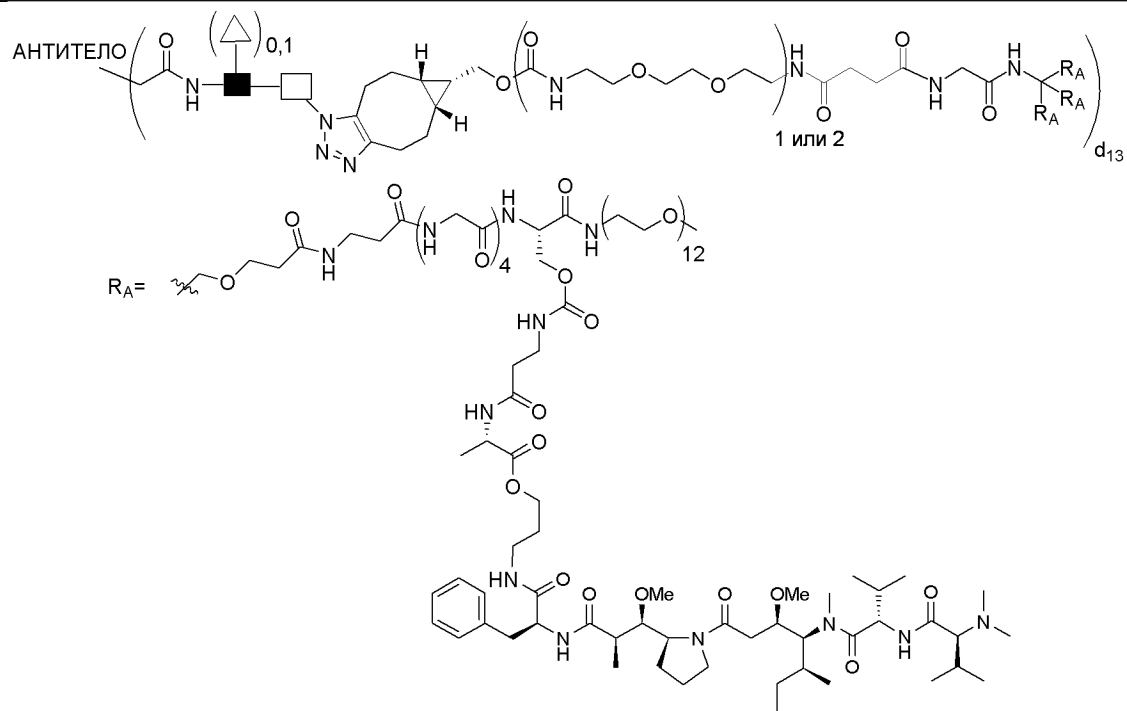
[760] В некоторых вариантах осуществления модифицированный конъюгат антитело против В7-Н4-лекарственное средство с частью цитотоксического лекарственного средства выбирают из конъюгатов, приведенных в таблице В2.

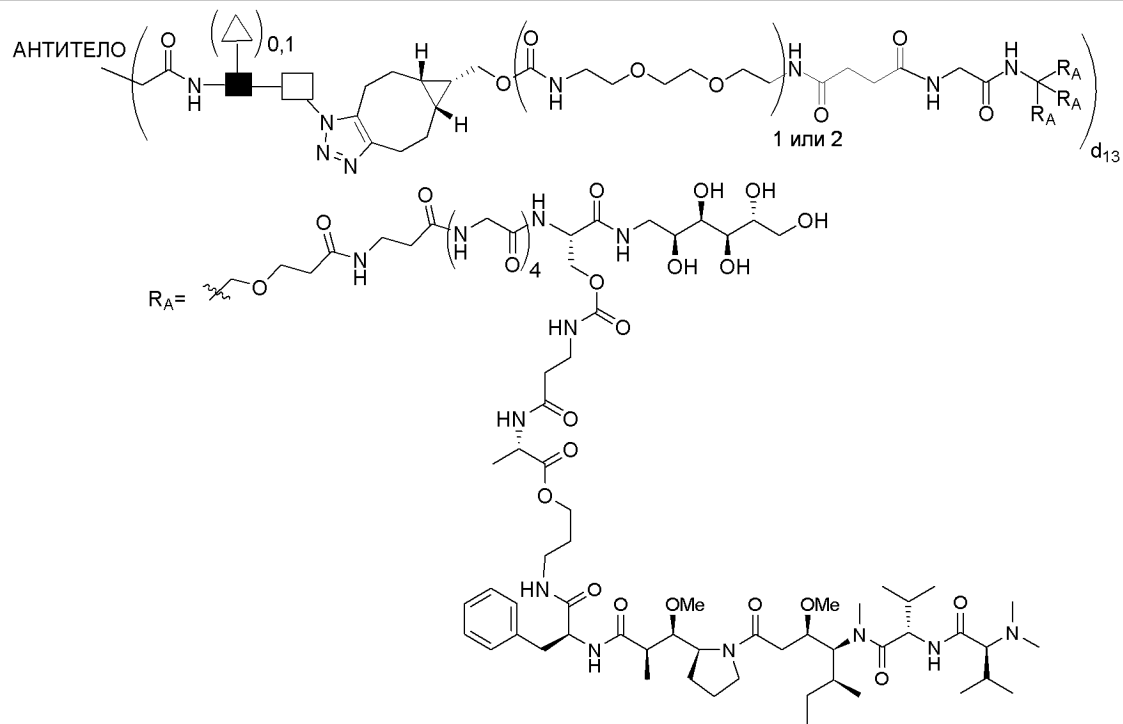
Таблица В2

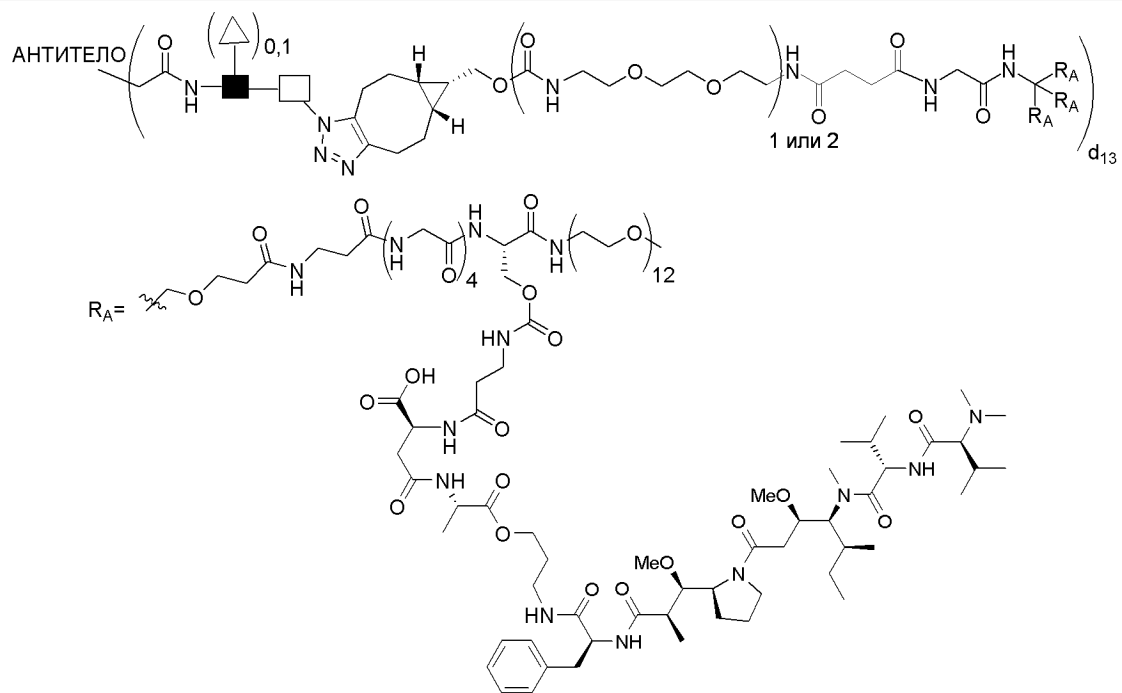


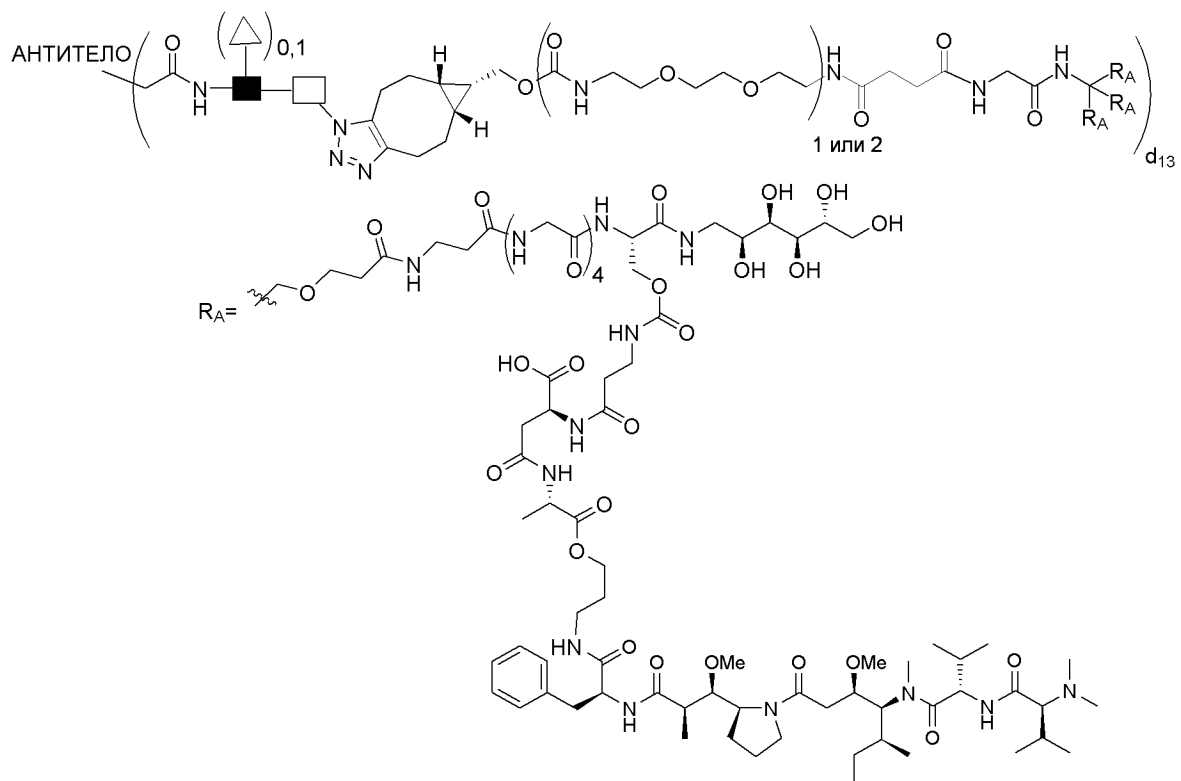


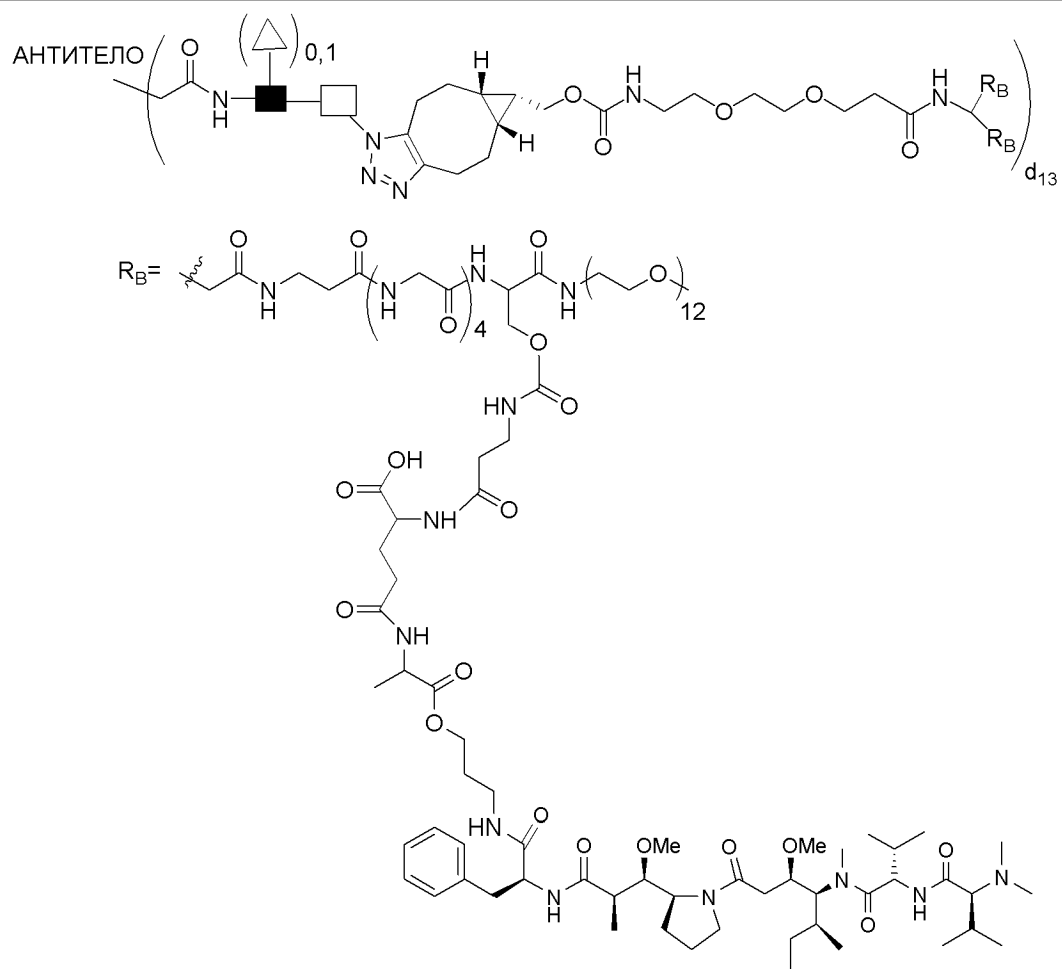


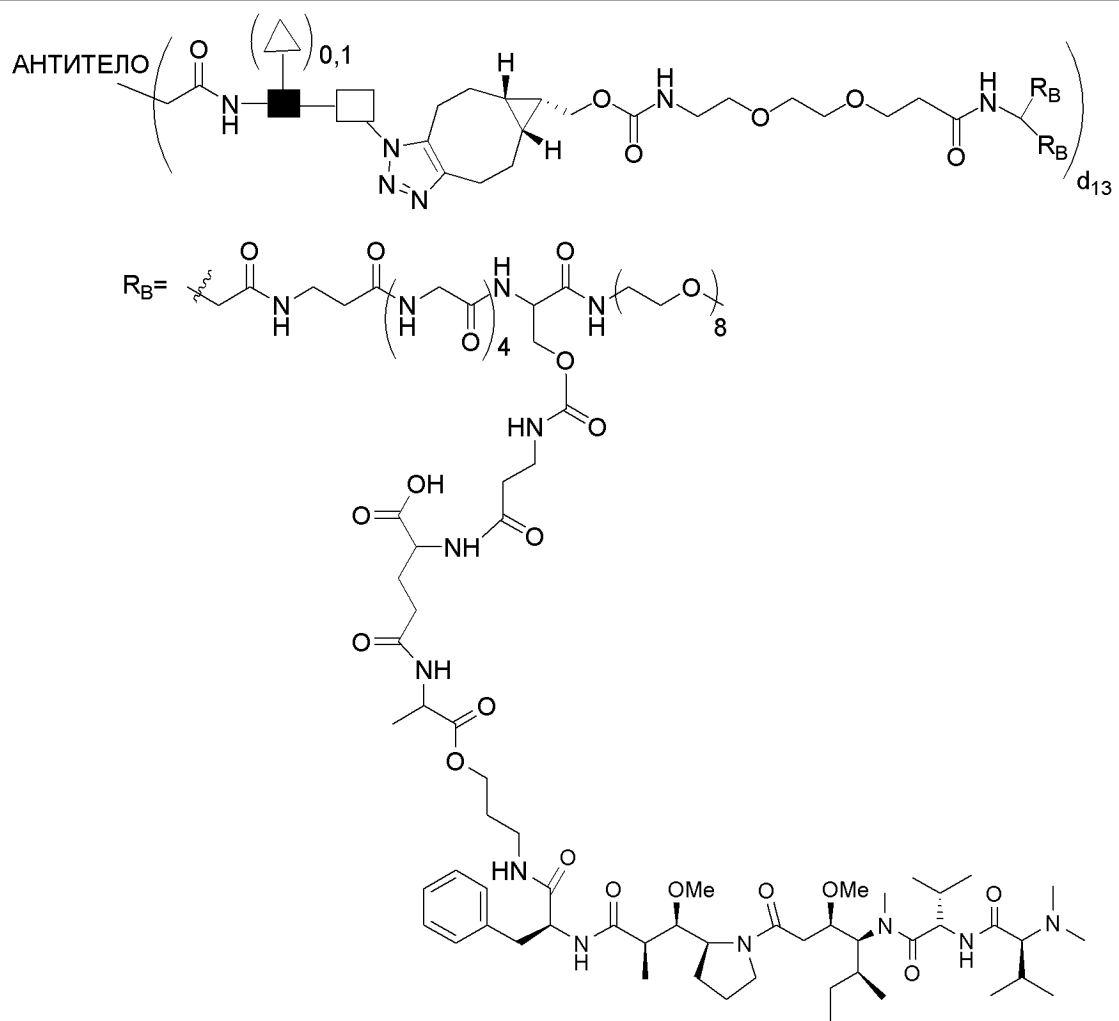


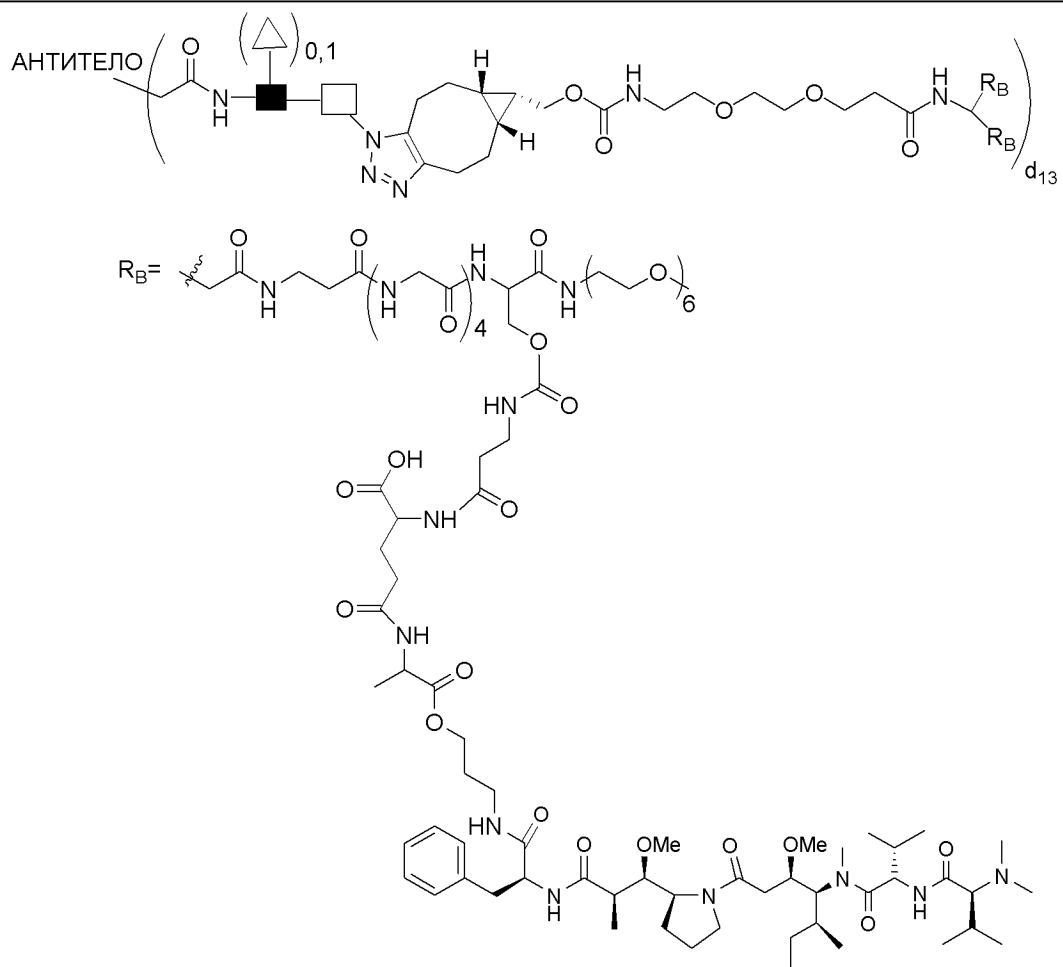




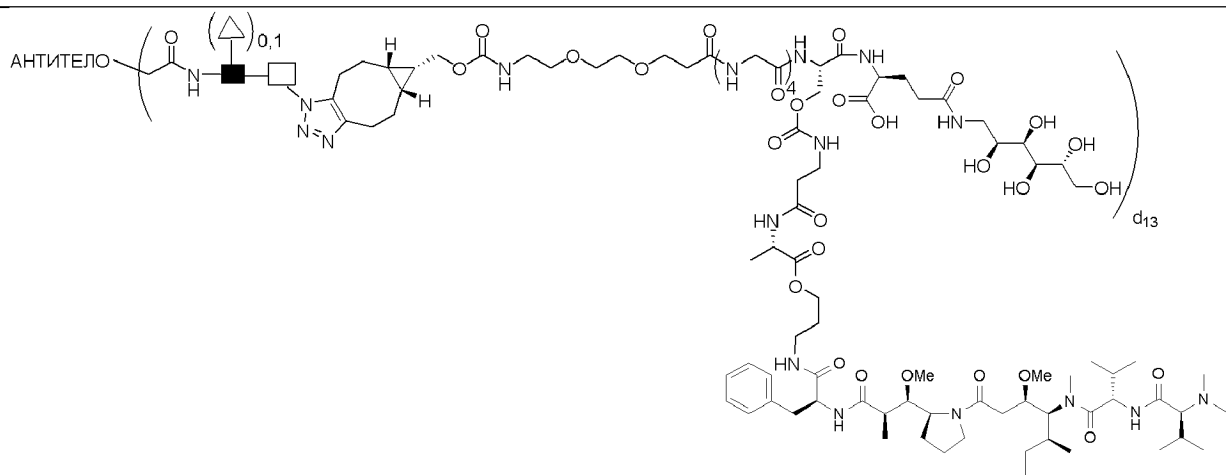
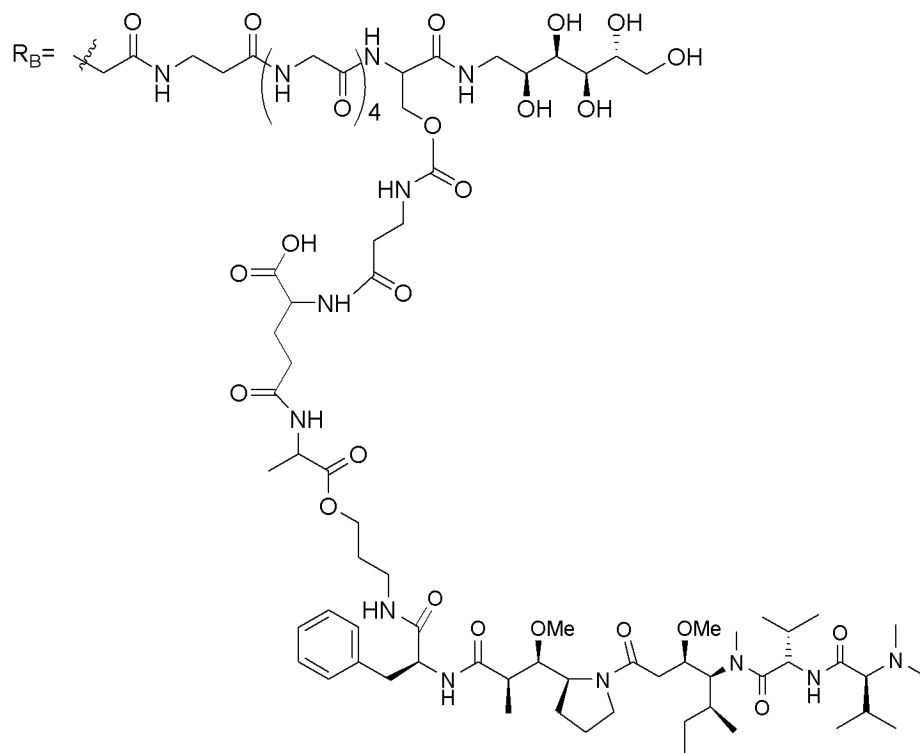
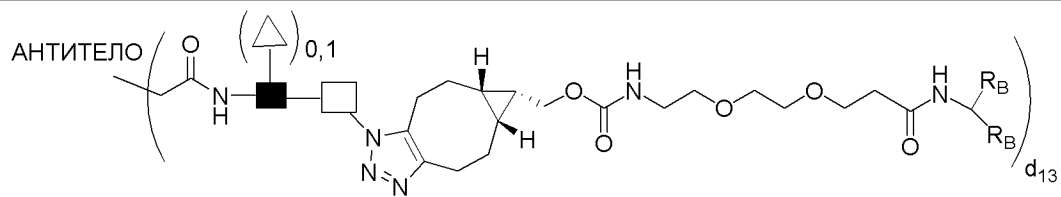




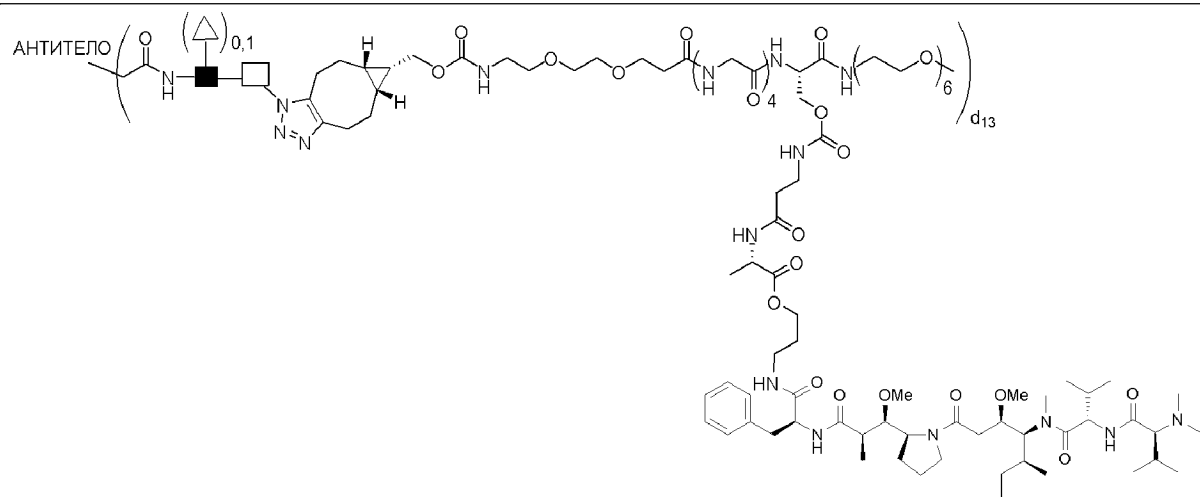




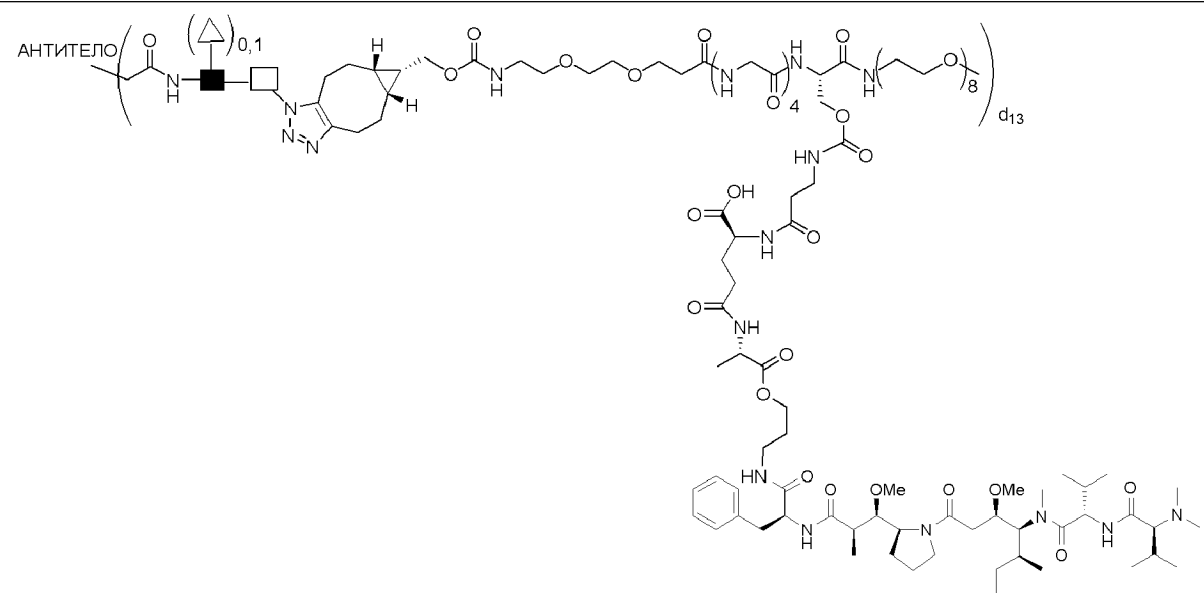
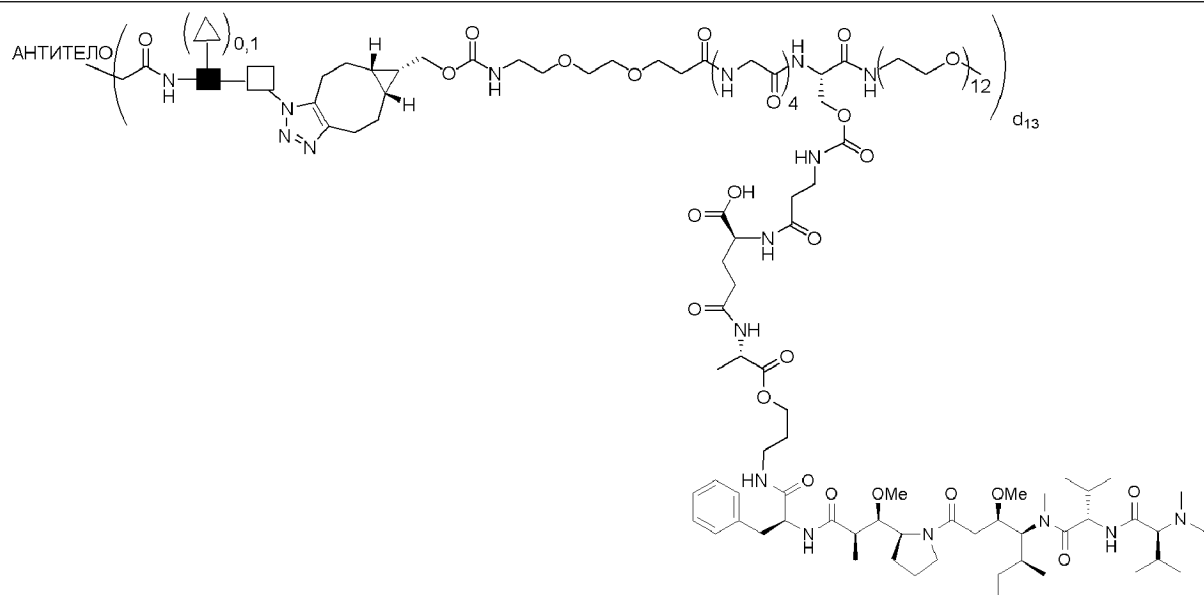
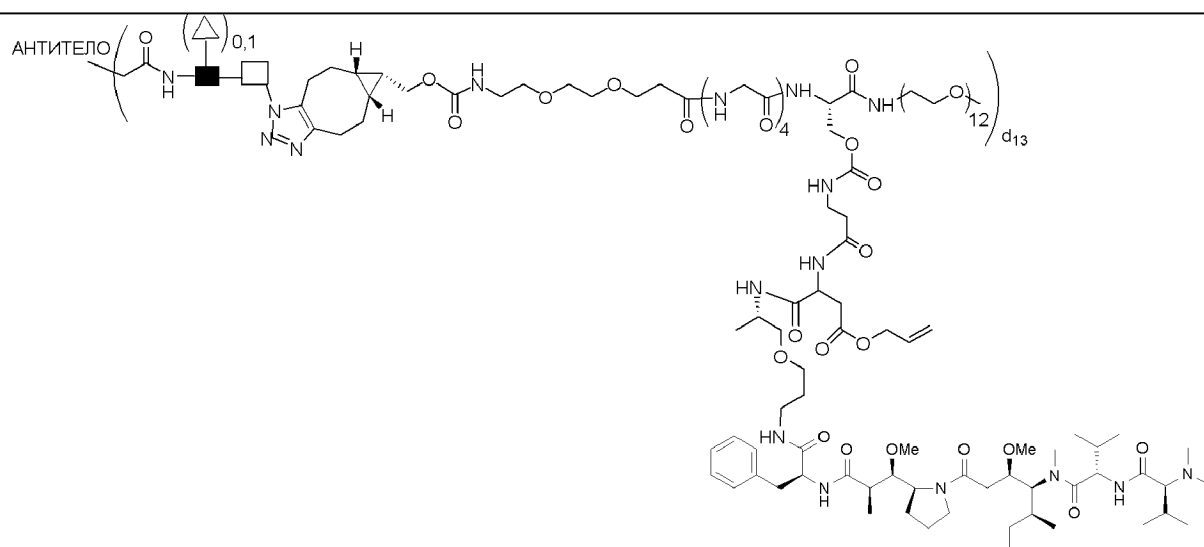
## Структура







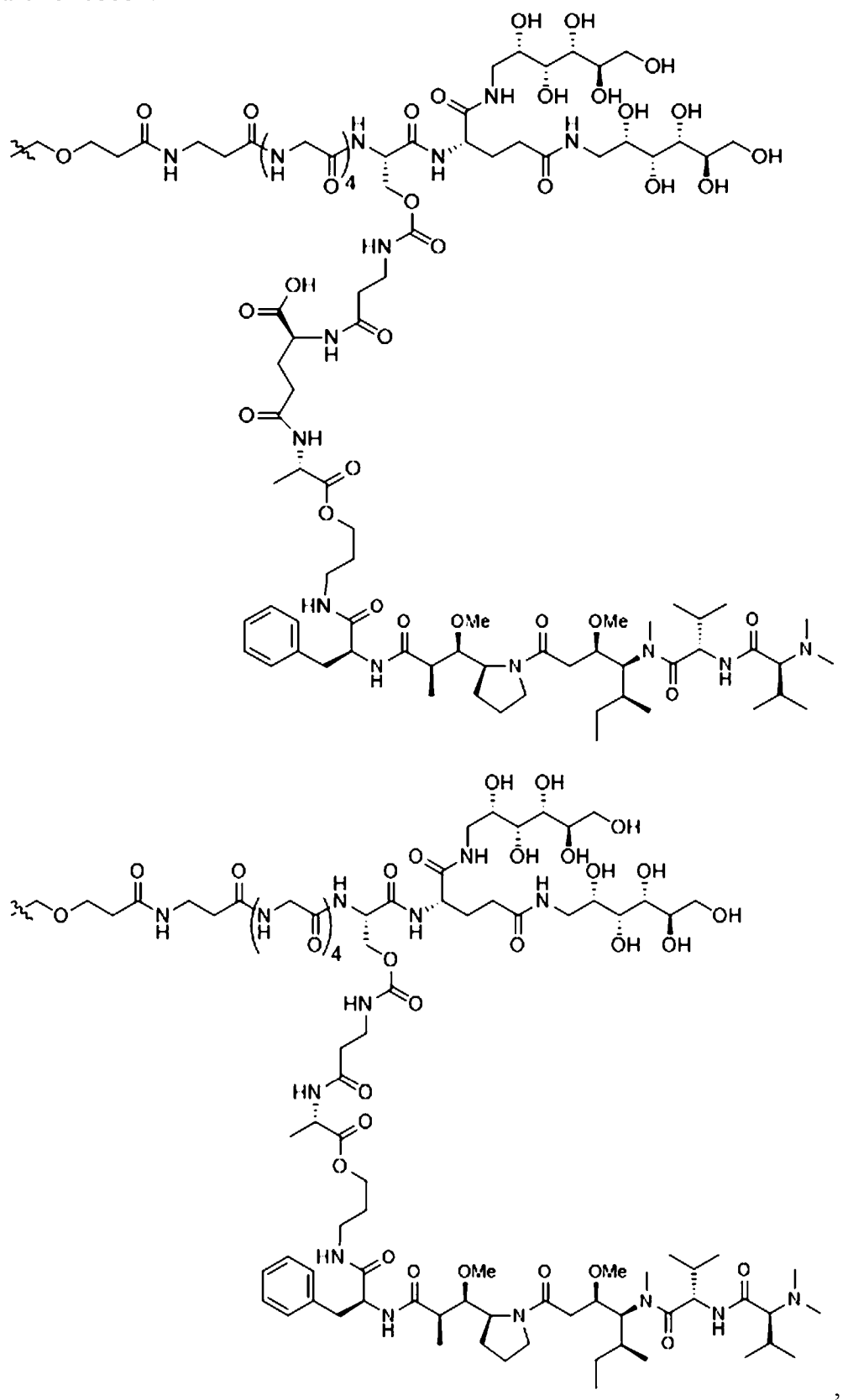
## Структура

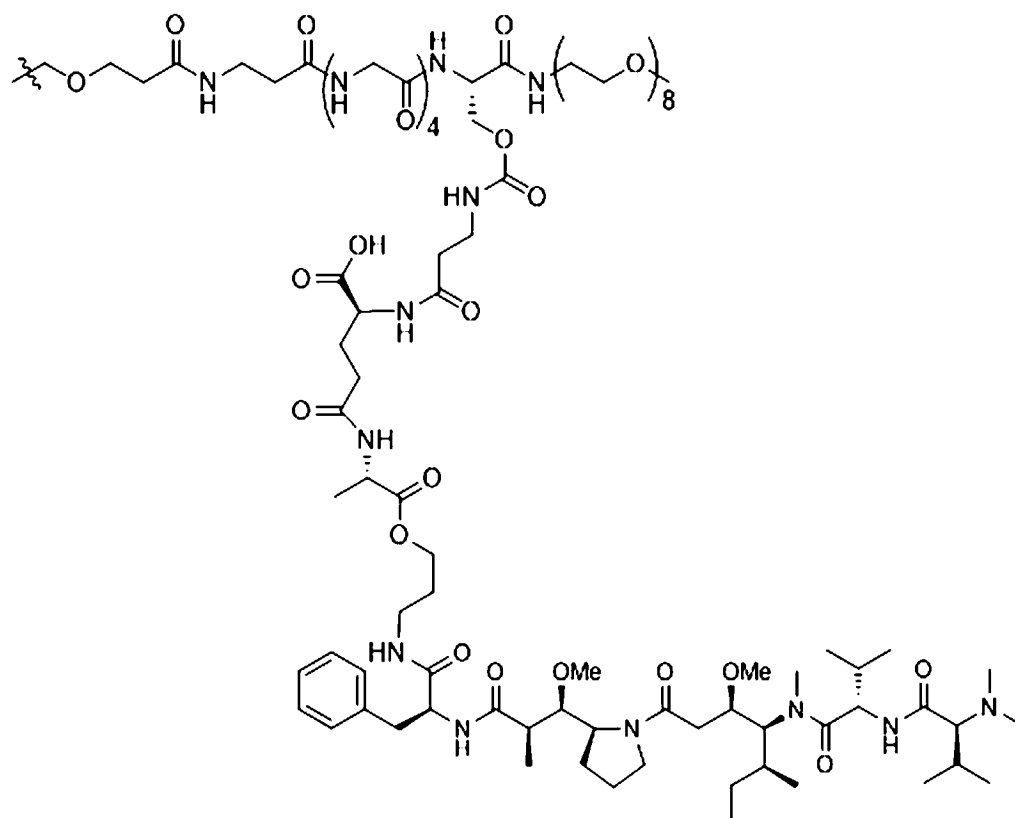
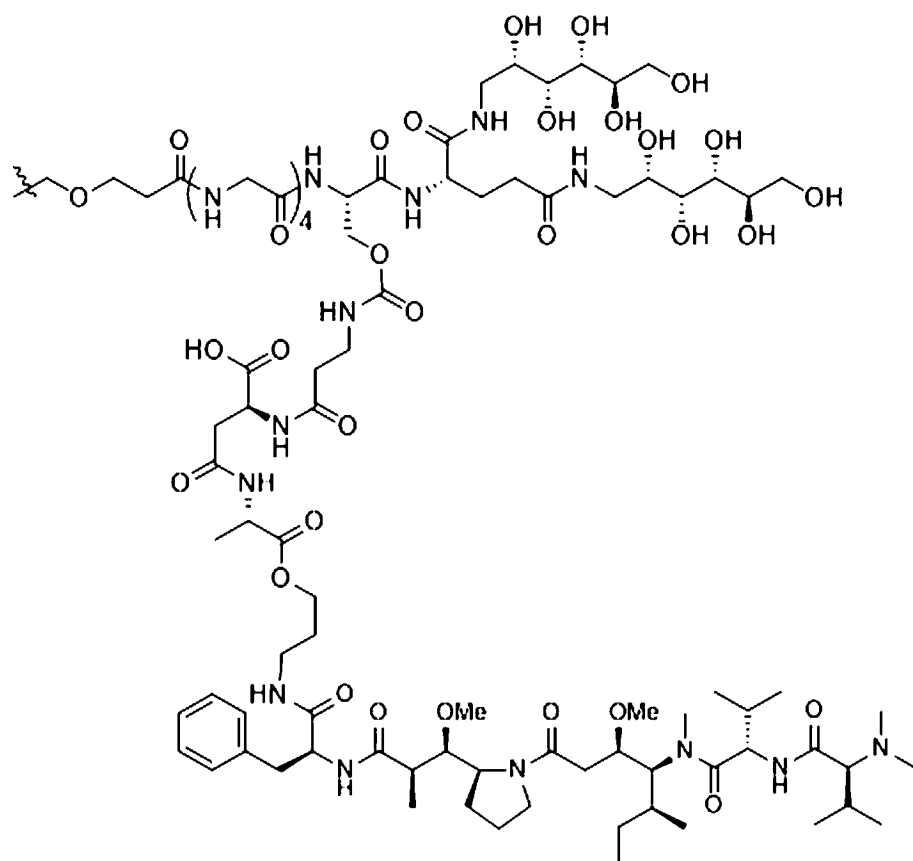


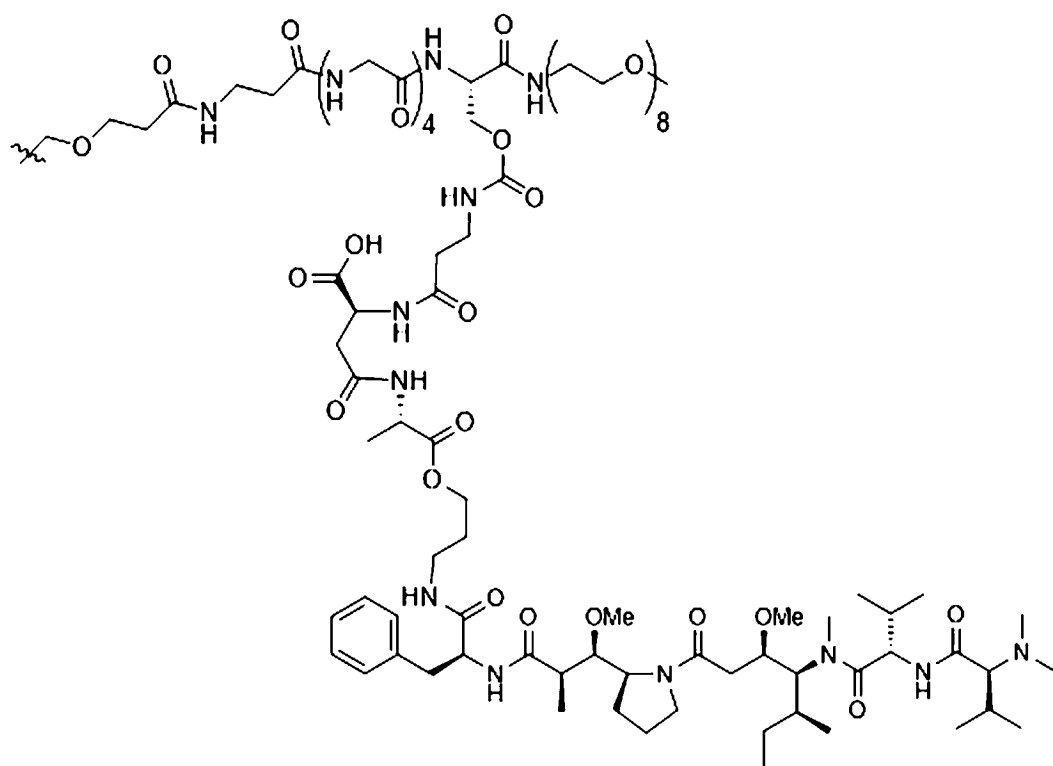
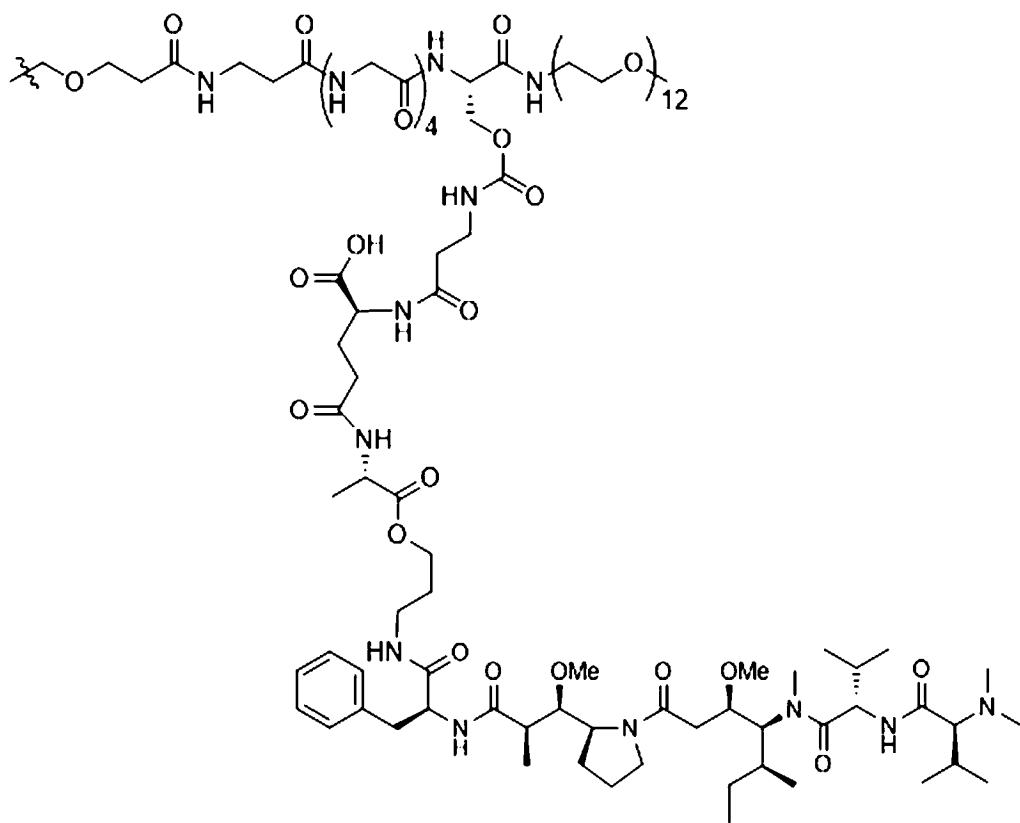
где:

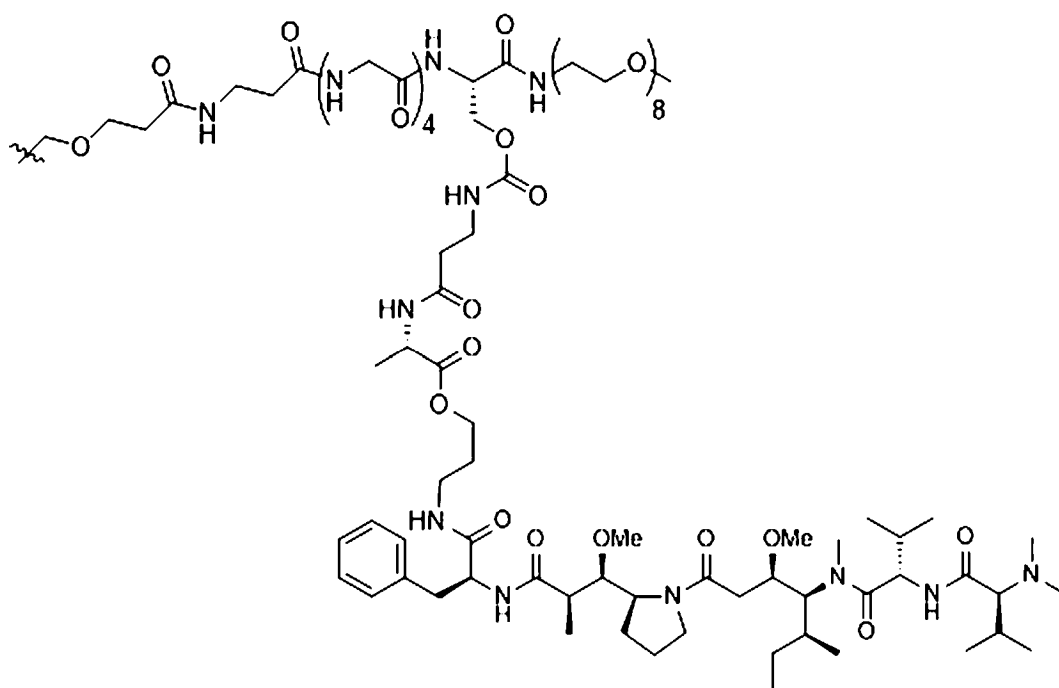
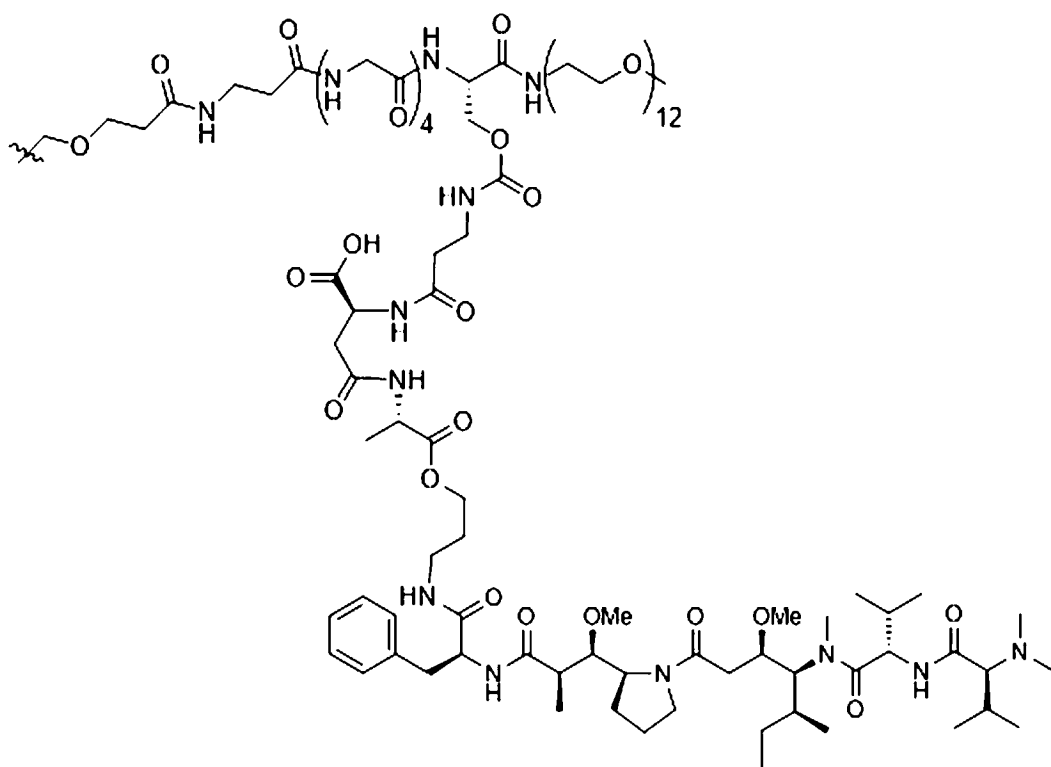


против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой:

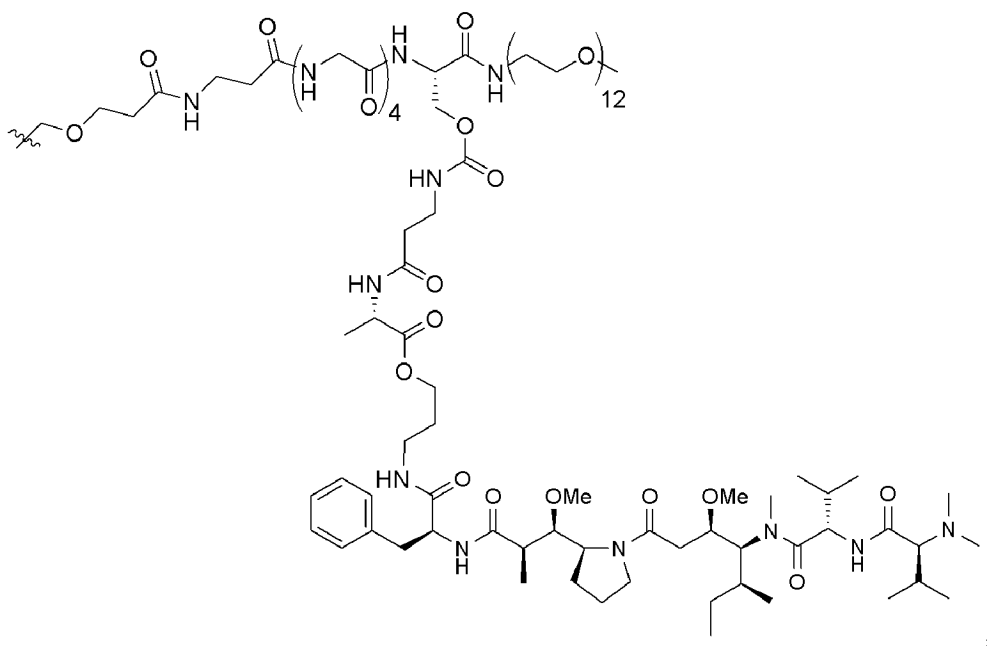






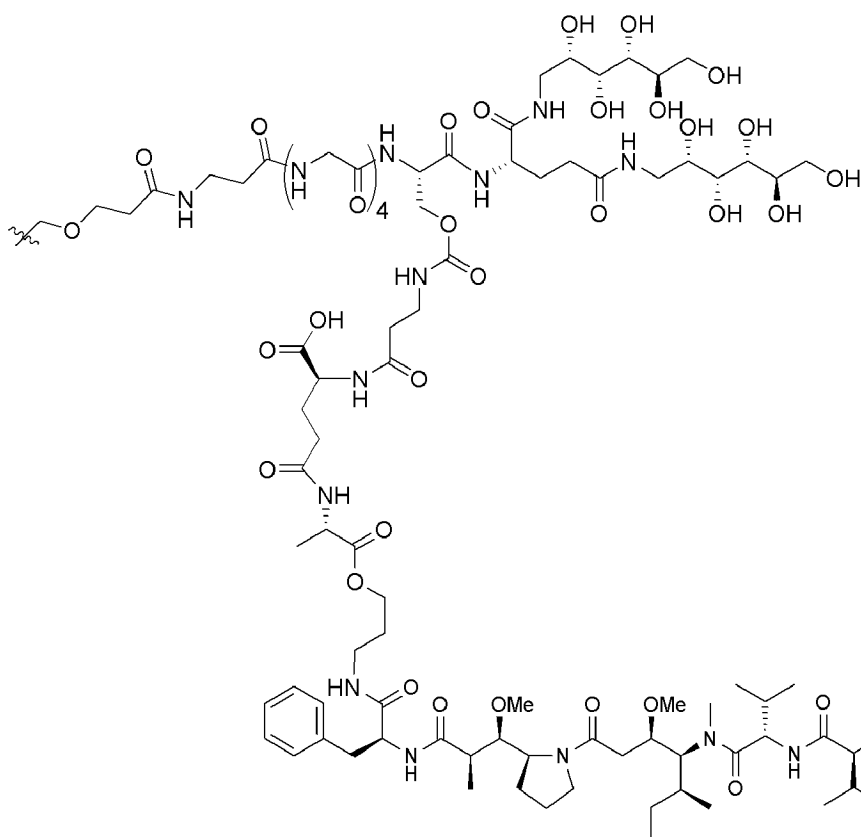


ИЛИ



где  $d_{13}$  равен 2; и модифицированное антитело против В7-Н4 содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенную с остальным конъюгатом.

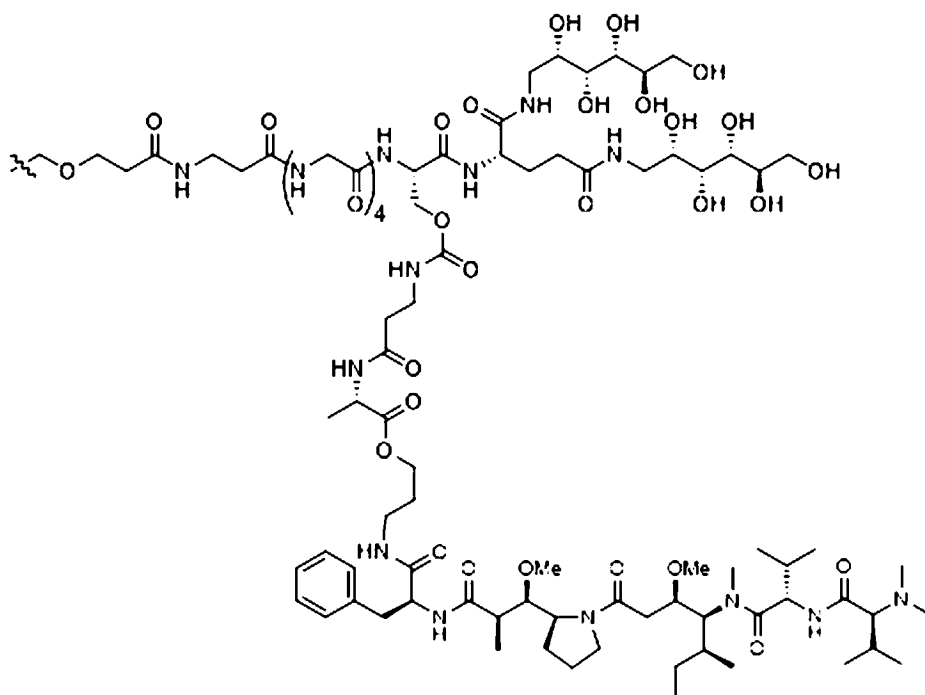
[763] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой



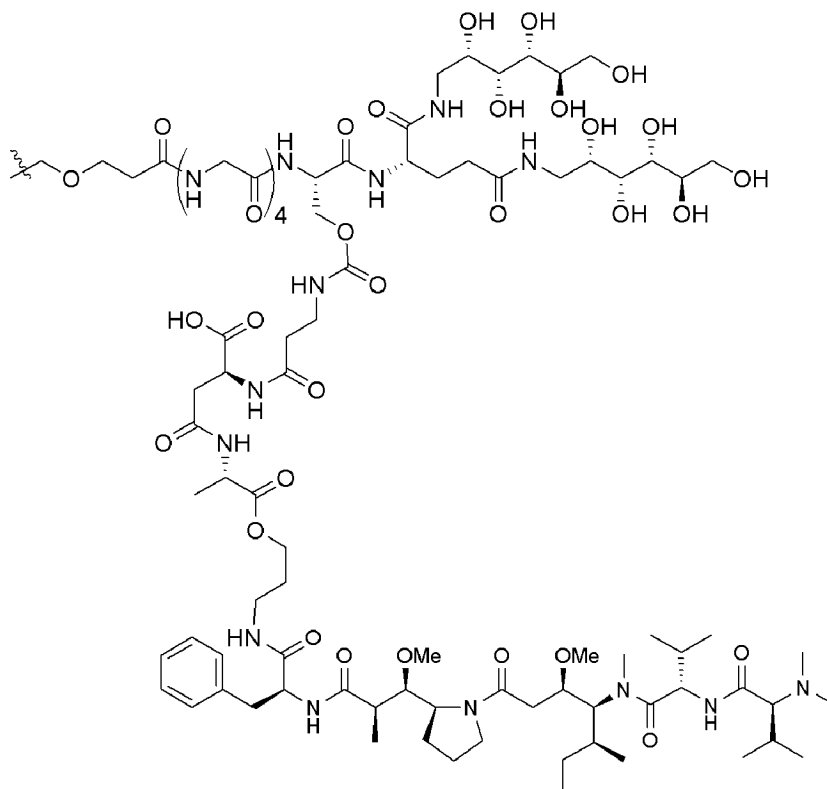
[764] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$



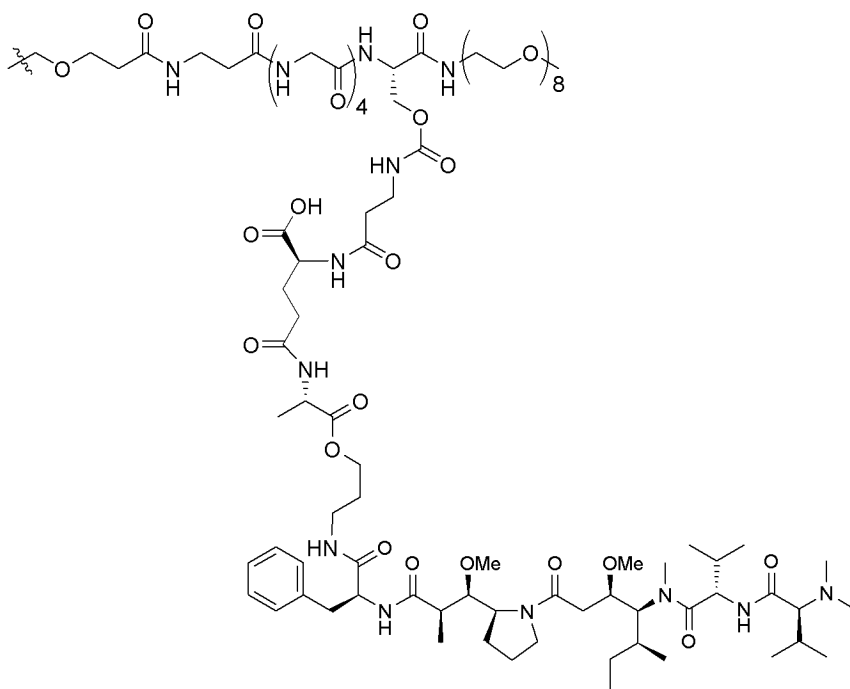
представляет собой



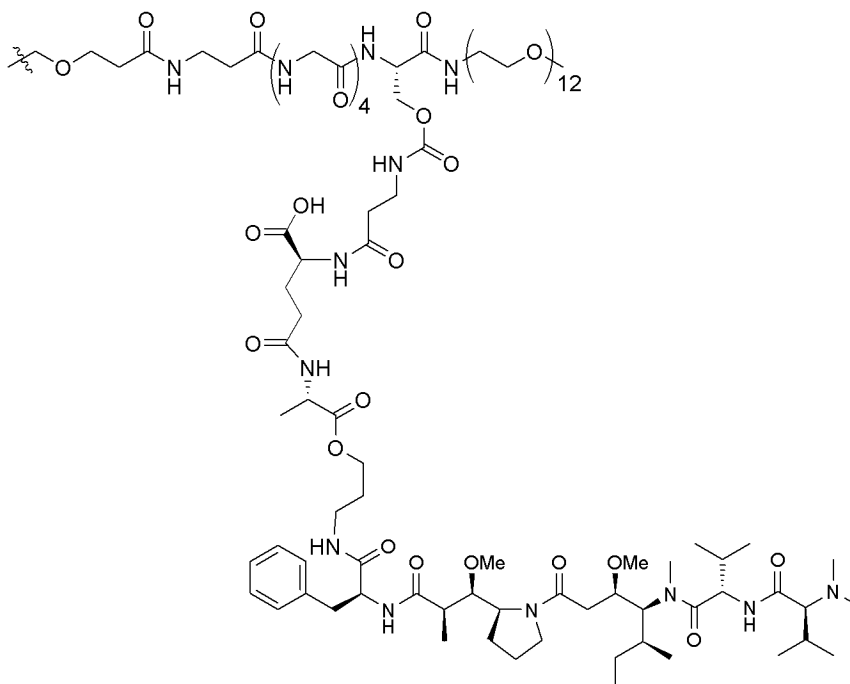
**[765]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый R<sub>A</sub> представляет собой



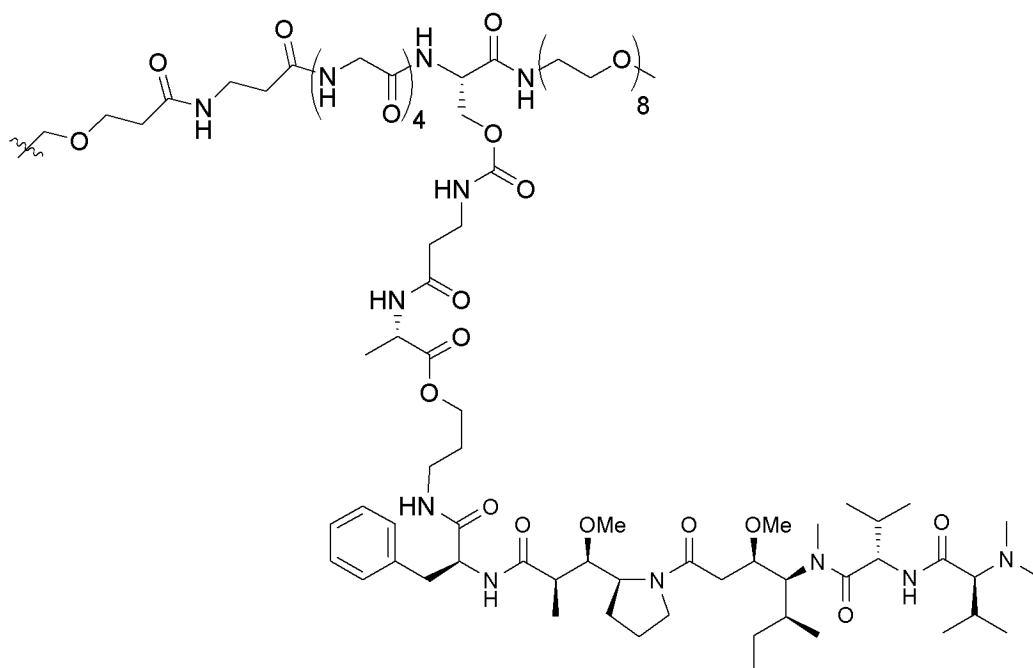
**[766]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый R<sub>A</sub> представляет собой



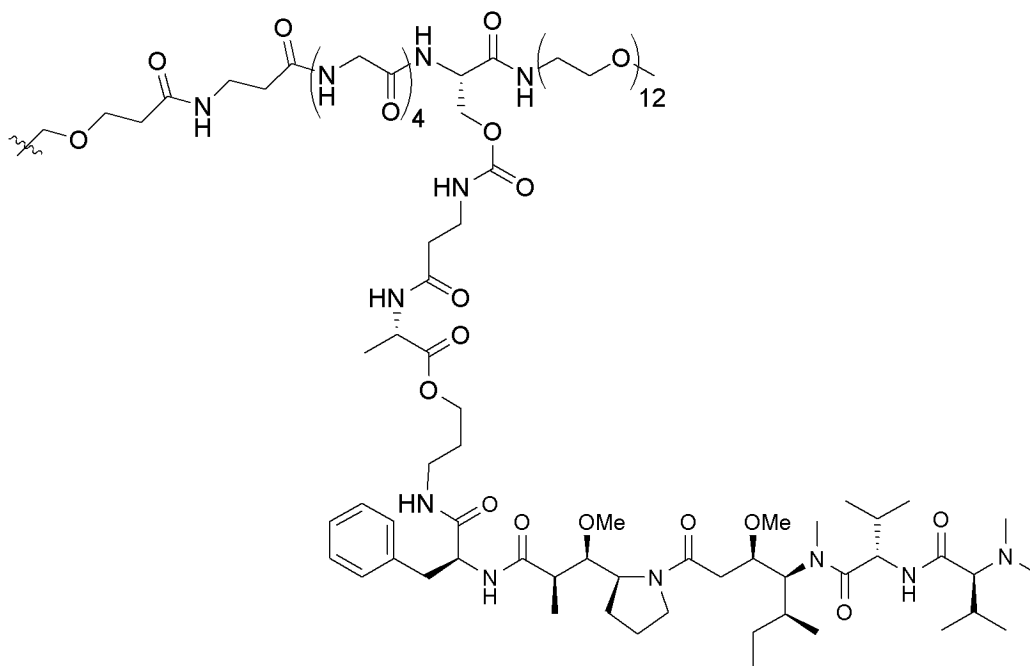
**[767]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой



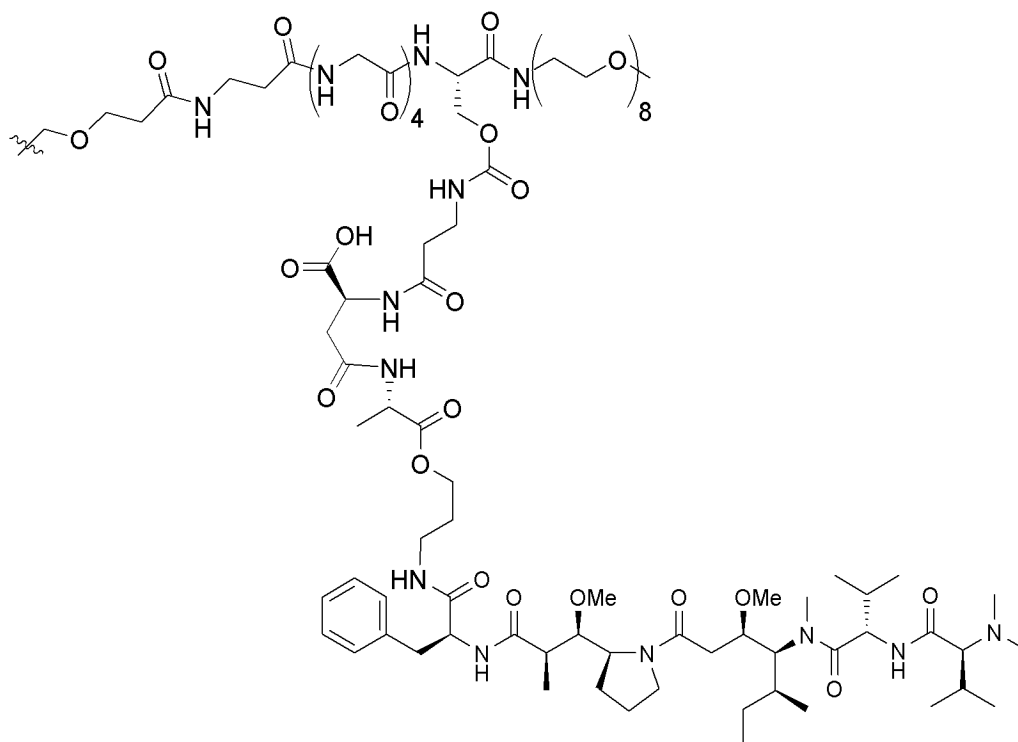
**[768]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой



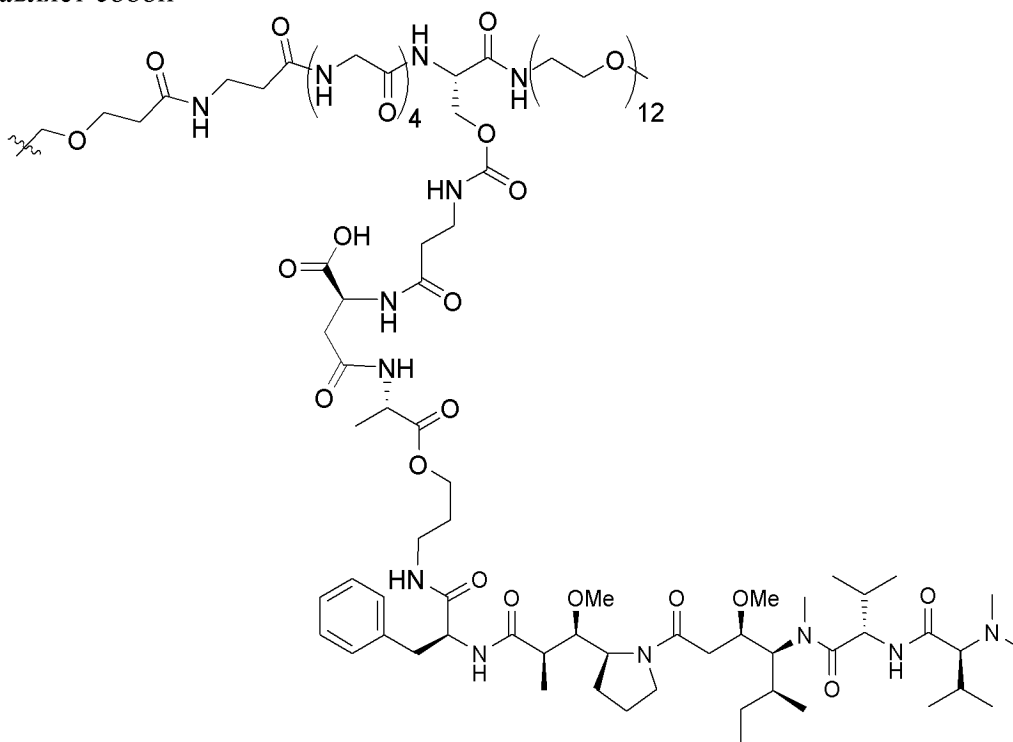
[769] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой



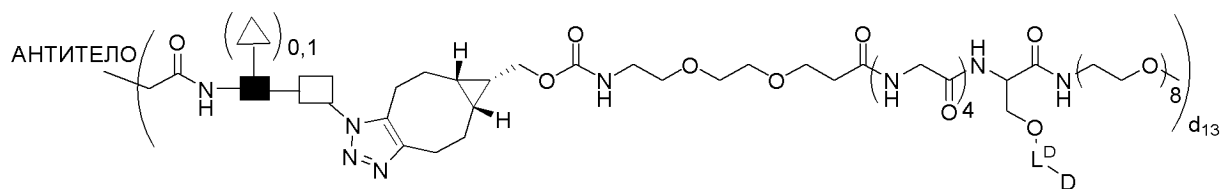
[770] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой:



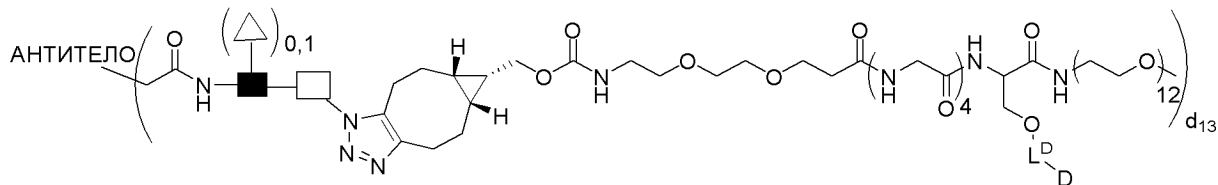
[771] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV), где каждый  $R_A$  представляет собой



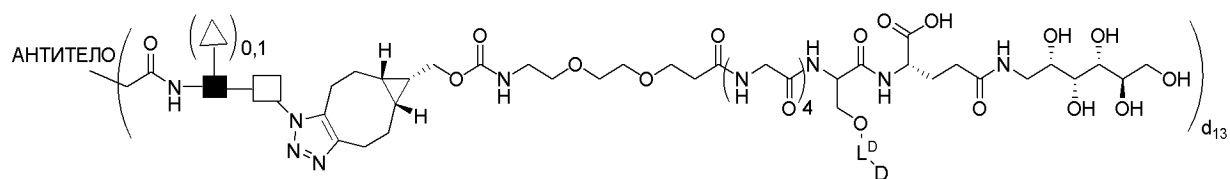
[772] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV-1), (XXXIV-2), (XXXIV-3) или (XXXIV-4):



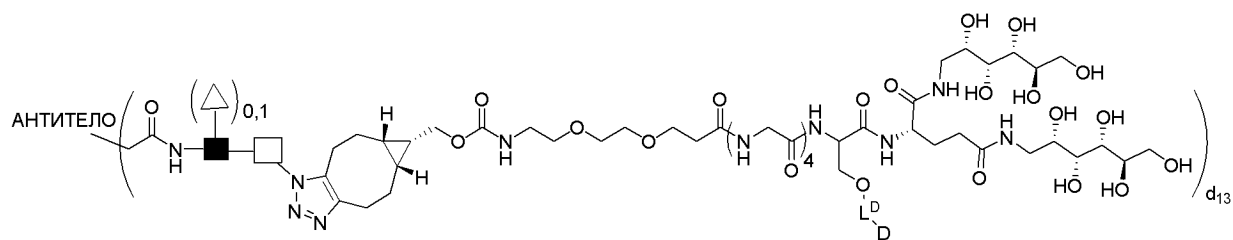
(XXXIV-1),



(XXXIV-2),

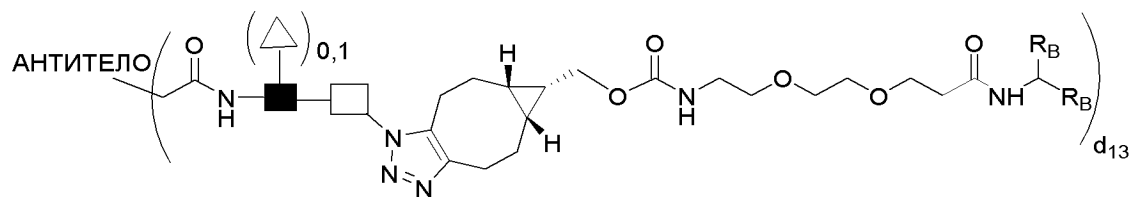


(XXXIV-3) или



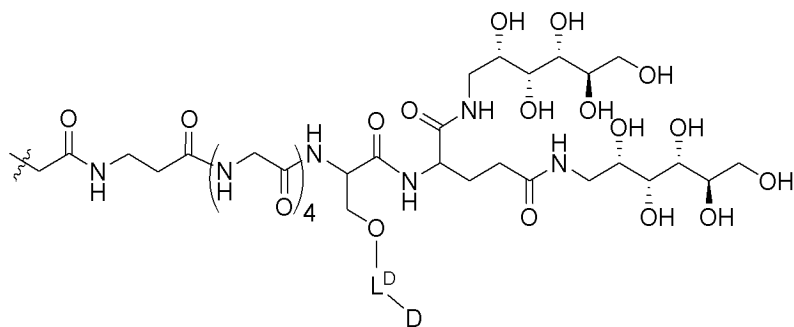
(XXXIV-4).

[773] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXV):

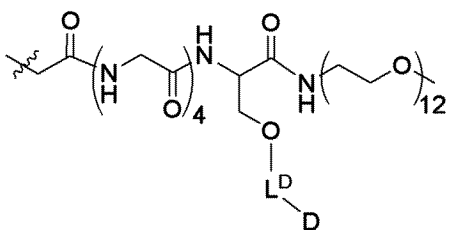
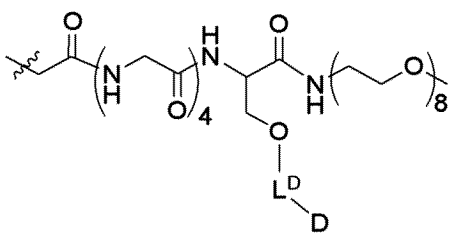
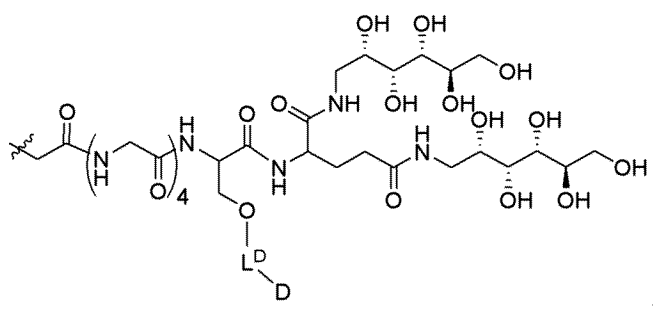
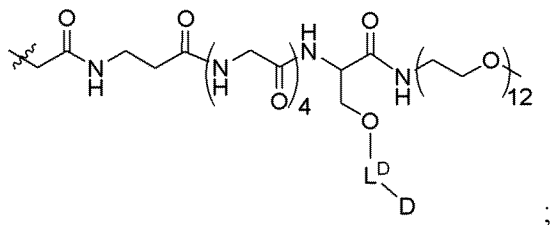
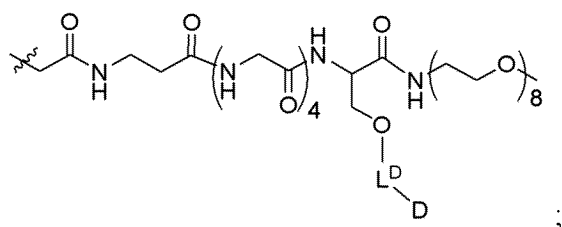


(XXXV),

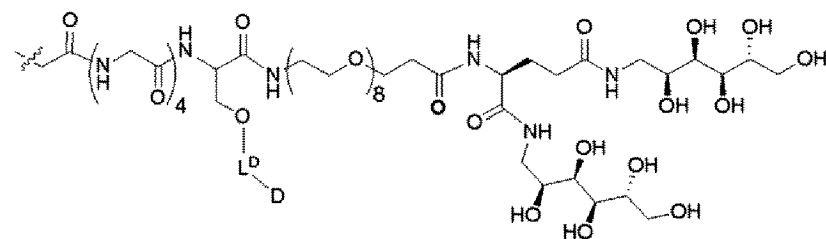
где каждый  $R_B$  представляет собой:



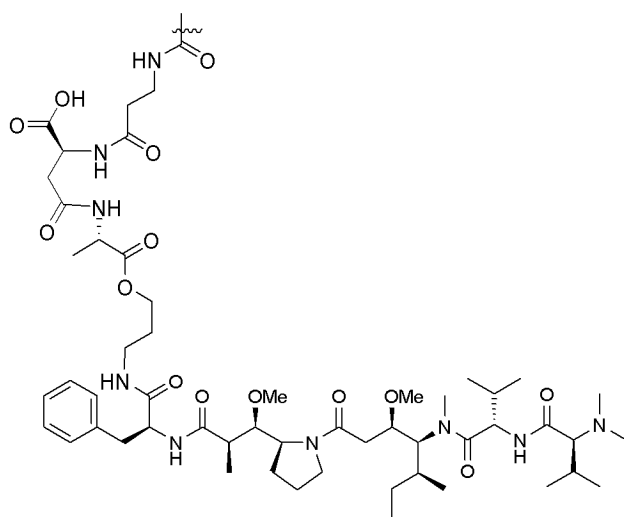
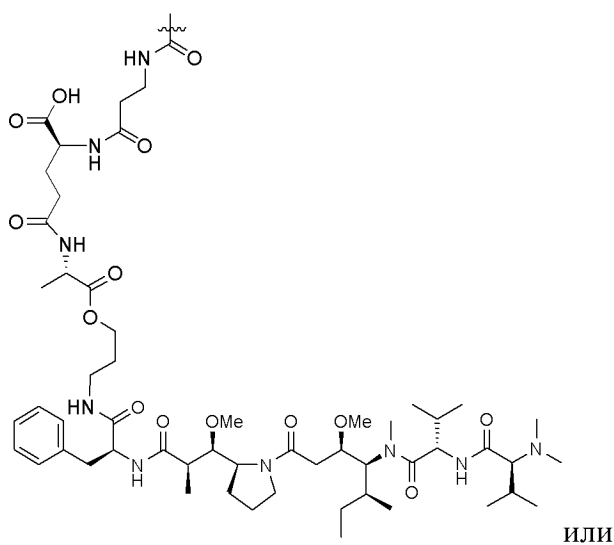
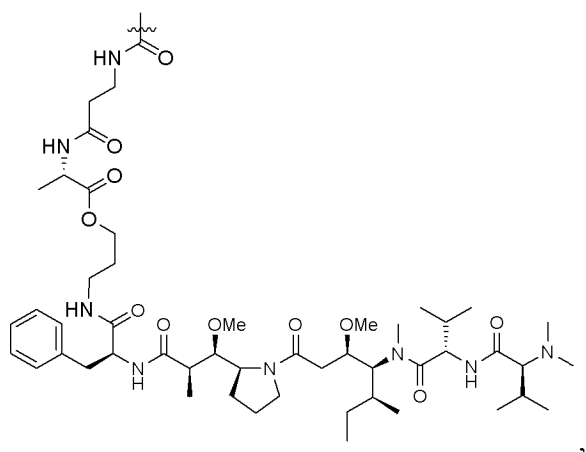
; ;



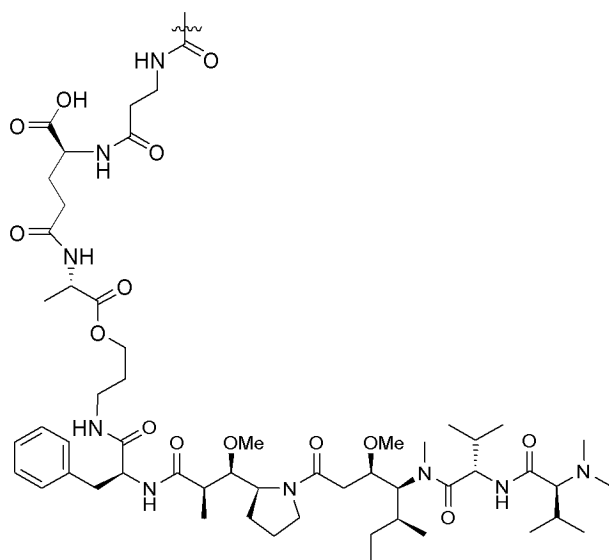
ИЛИ



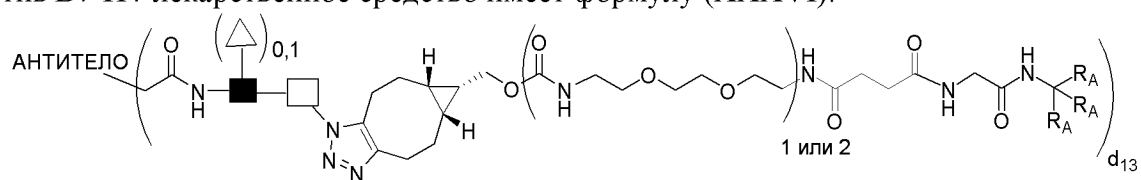
**[774]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV-1), (XXXIV-2), (XXXIV-3), (XXXIV-4) или (XXXV), где часть -L<sup>D</sup>-D представляет собой:



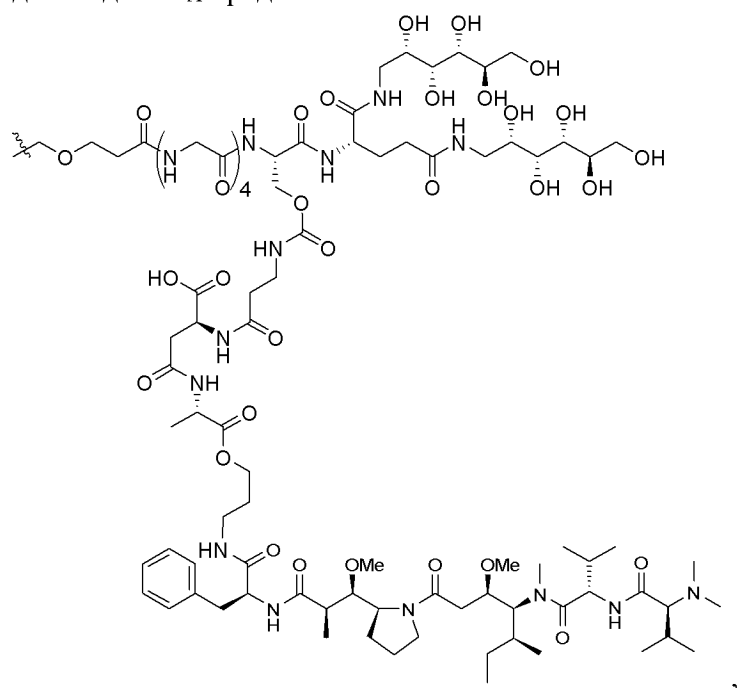
[775] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXIV-1), (XXXIV-2), (XXXIV-3), (XXXIV-4) или (XXXV), где часть представляет собой -L<sup>D</sup>-D:



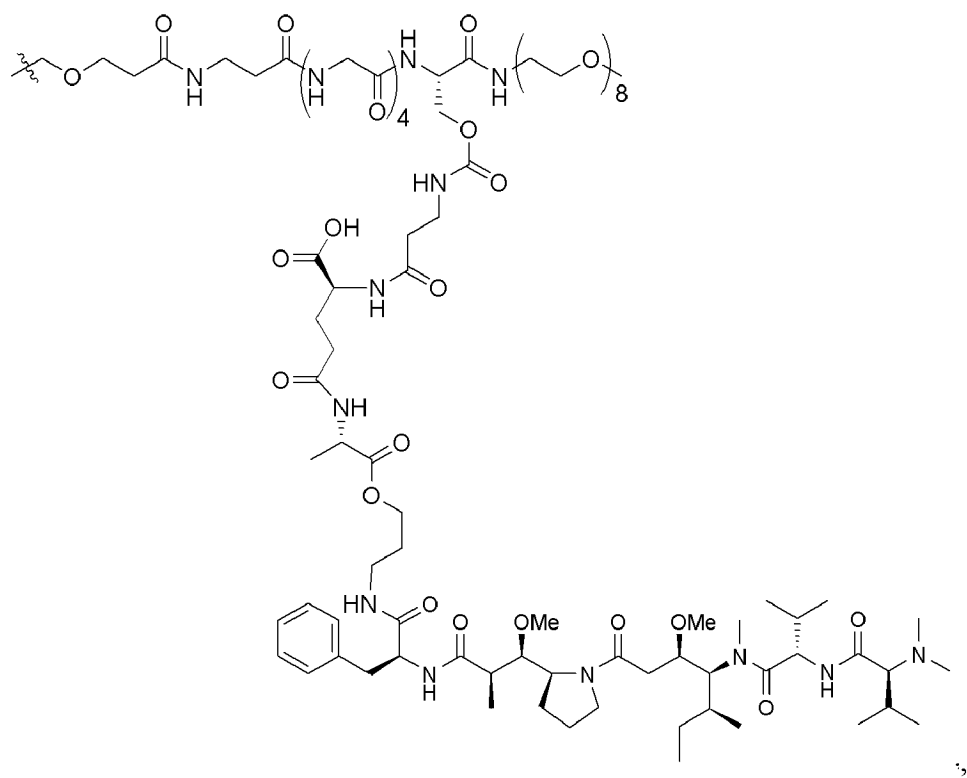
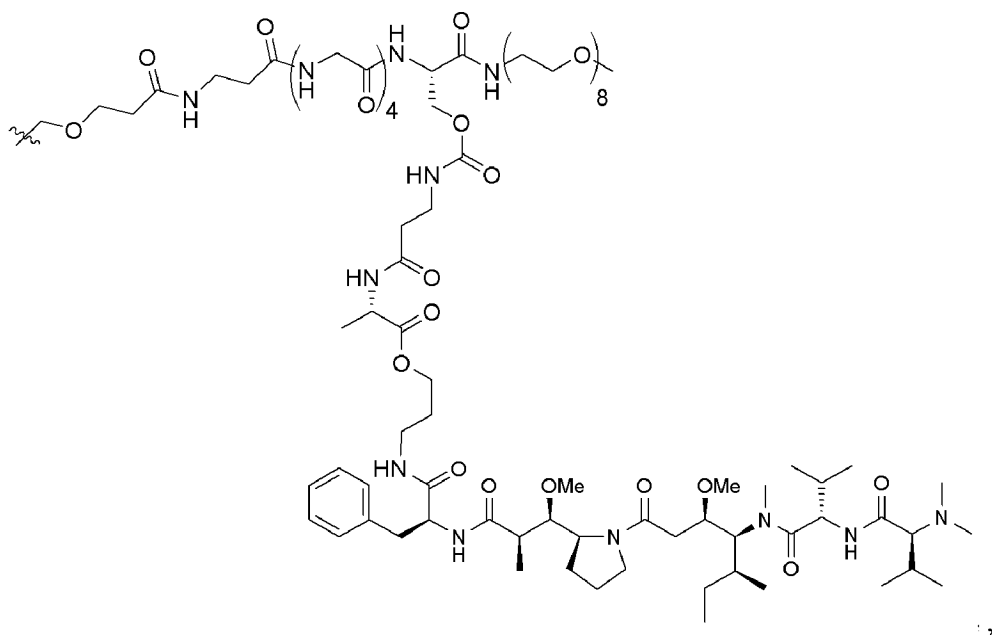
[776] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство имеет формулу (XXXVI):

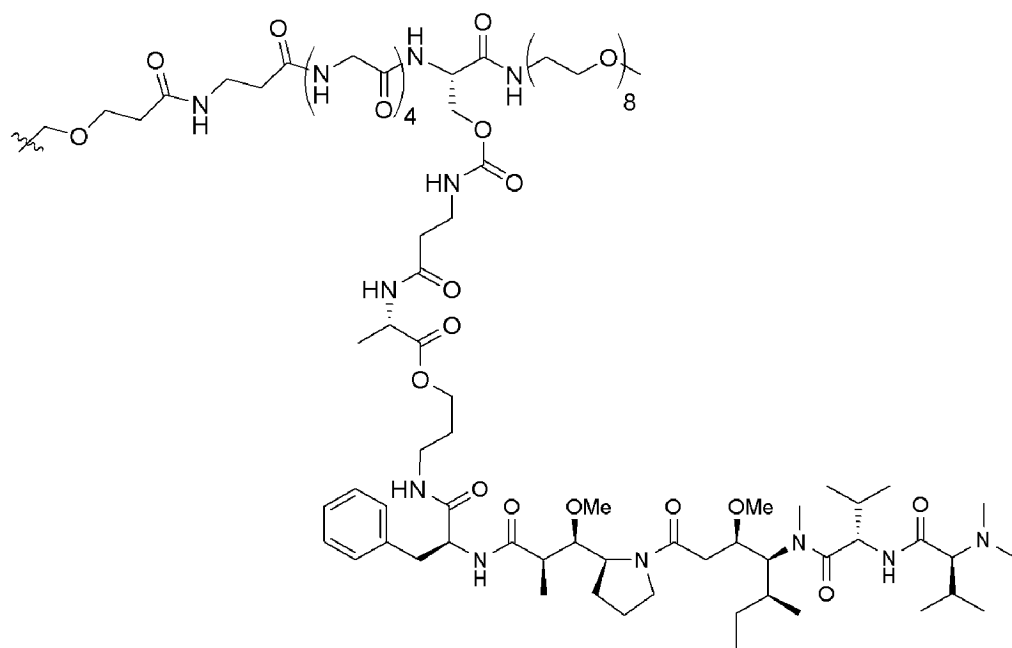
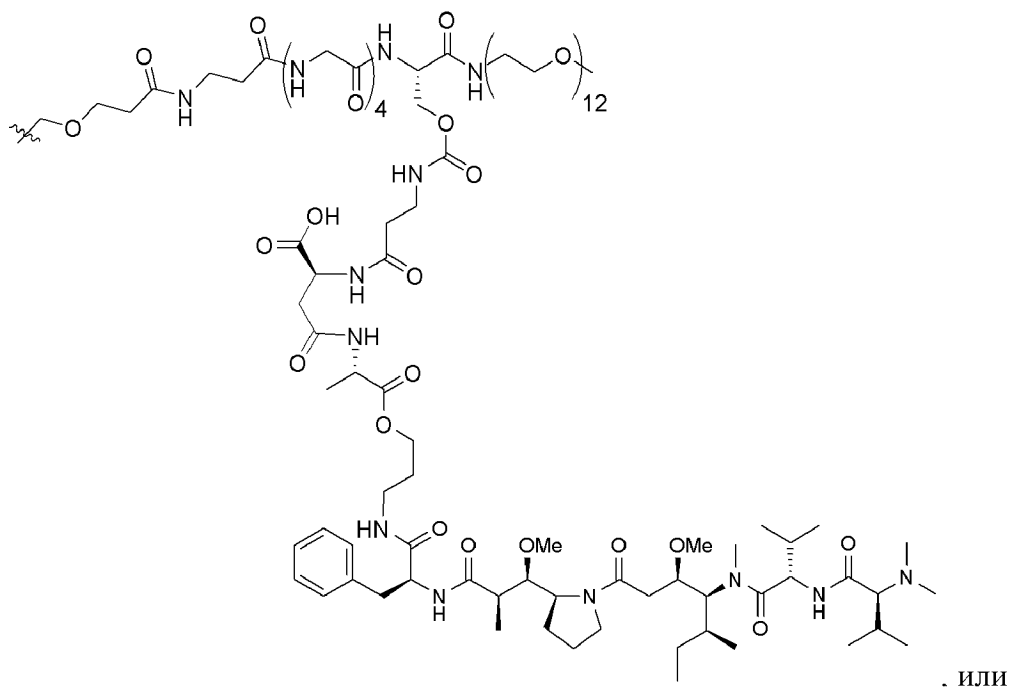


где каждый  $R_A$  представляет собой

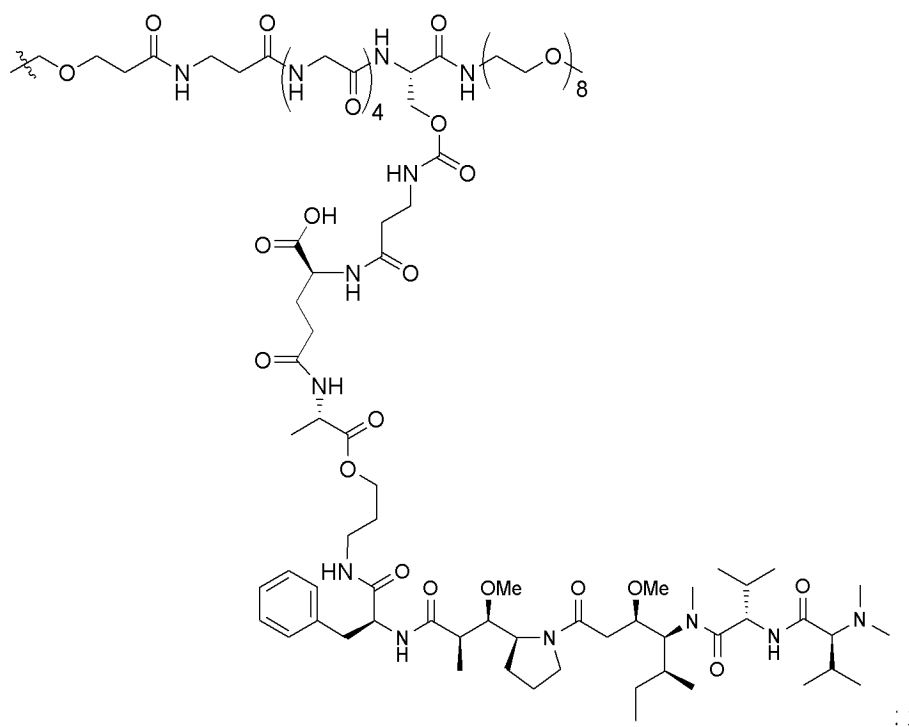






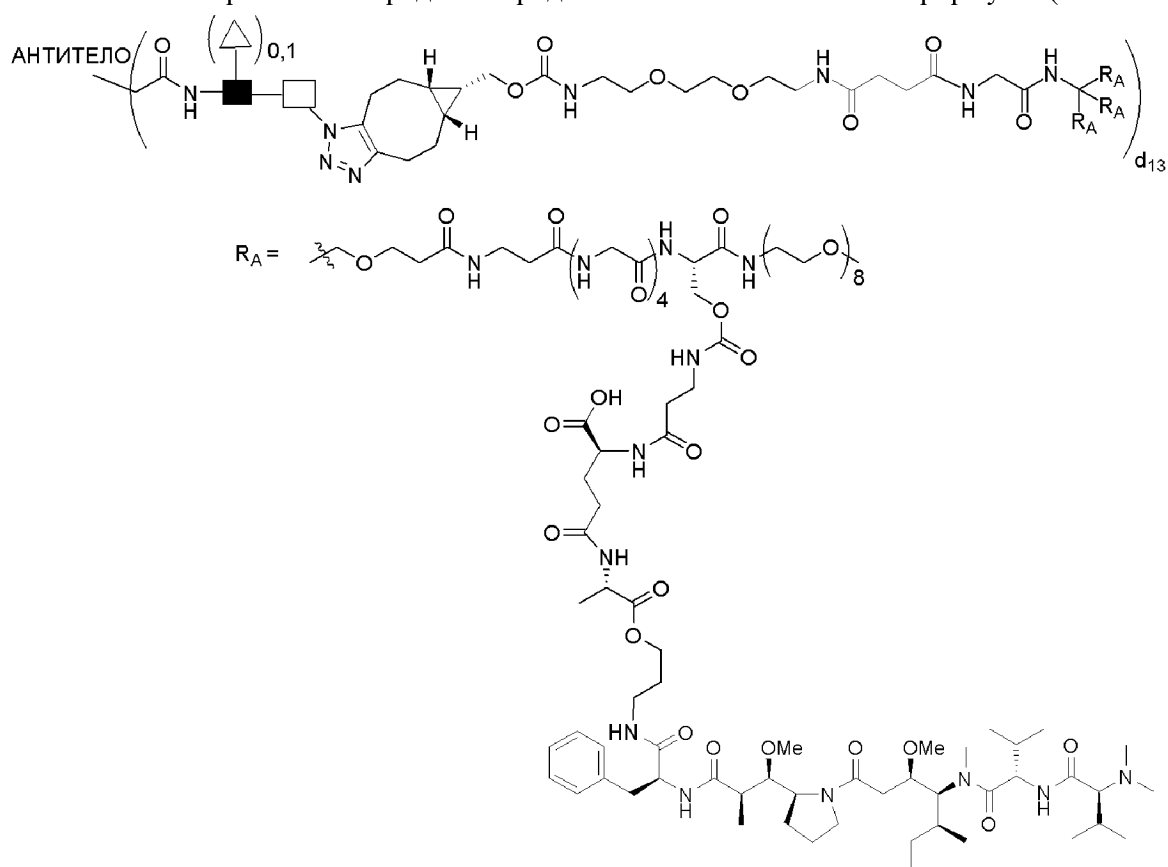


[777] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство представляет собой конъюгат формулы (XXXVI), где каждый  $R_A$  представляет собой



где модифицированное антитело против В7-Н4 содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенных с остальной частью конъюгата.

[778] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против В7-Н4-лекарственное средство представляет собой конъюгат формулы (XXXVII):



(XXXVII)

где

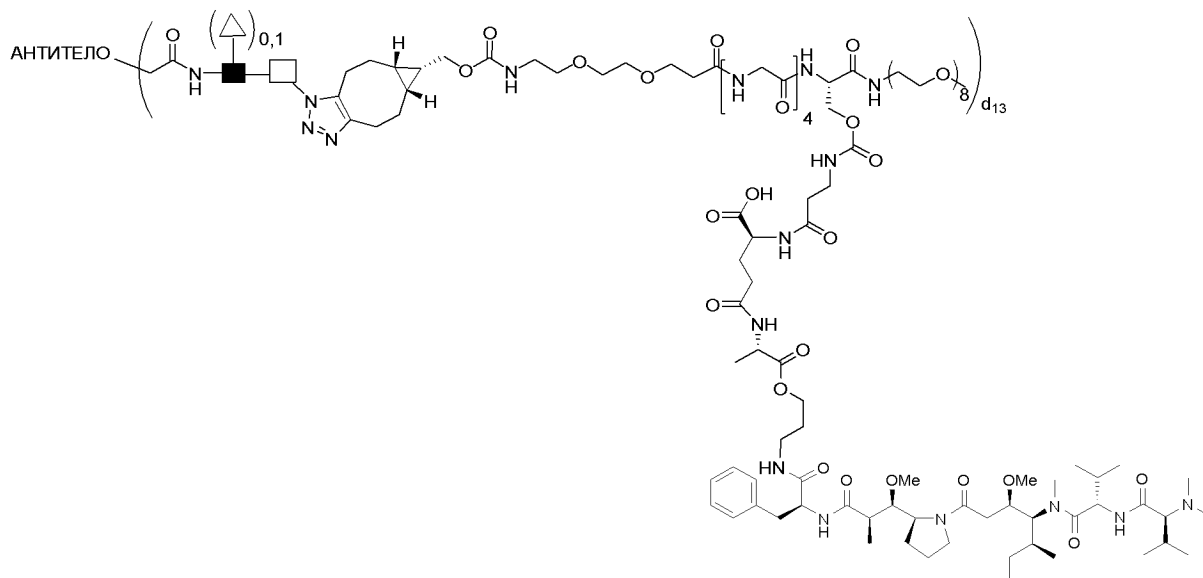
$d_{13}$  равен 2;

АНТИТЕЛО представляет собой антитело против B7-H4, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55),

часть линкер-лекарственное средство присоединена к группе аспарагина на N297 антитела против B7-H4;

■ представляет собой GlcNAc;  $\Delta$  представляет собой Fuc и □ представляет собой GalNAc.

[779] В некоторых вариантах осуществления конъюгат модифицированное антитело против B7-H4-лекарственное средство представляет собой конъюгат формулы (XXXVIII):



(XXXVIII)

где

$d_{13}$  представляет собой целое число 2;

АНТИТЕЛО представляет собой антитело против B7-H4, содержащее: определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2),

определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55),

часть линкер-лекарственное средство присоединена к группе аспарагина на N297 антитела;

■ представляет собой GlcNAc;  $\Delta$  представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

### Способы применения

**[780]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании.

**[781]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании.

**[782]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму конъюгата, описанного в настоящем описании.

**[783]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму конъюгата, описанного в настоящем описании.

**[784]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения В7-Н4-положительной злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании.

**[785]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

конъюгату, описанному в настоящем описании, для применения для лечения или предупреждения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[786]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату, описанному в настоящем описании, для применения для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[787]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для лечения злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для лечения В7-Н4-положительной экспрессирующей злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[788]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[789]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[790]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата, описанного в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения В7-Н4-положительной экспрессирующей злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[791]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[792]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

**[793]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата для лечения злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата для лечения В7-Н4-положительной экспрессирующей злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании.

[794] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного конъюгата по изобретению; где указанный конъюгат высвобождает одно или несколько терапевтических средств при биодegradации.

[795] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного конъюгата по изобретению; где указанный конъюгат высвобождает одно или несколько терапевтических средств при биодegradации.

[796] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

[797] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества конъюгата антител против В7-Н4-лекарственное средство, описанного в настоящем описании.

[798] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу, включающему введение индивидууму конъюгата антител против В7-Н4-лекарственное средство, описанного в настоящем описании.

[799] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации В7-Н4-положительной клетки, причем способ включает воздействие на клетку конъюгата антител против В7-Н4-лекарственное средство в условиях, позволяющих связывание конъюгата антител против В7-Н4-лекарственное средство с В7-Н4 на поверхности клетки с последующей интернализацией, тем самым ингибируя пролиферацию клетки. В определенных вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro* или *in vivo*. В следующих вариантах осуществления клетка представляет собой клетку молочной железы, яичника или эндометрия.

[800] Ингибирование пролиферации клеток *in vitro* можно оценивать с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™, который является коммерчески доступным от Promega (Madison, Wis.). Этот анализ определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, который является показателем метаболически активных клеток. См. Crouch et al. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, патент США № 6602677. Анализ можно проводить в формате 96- или 384-лунок, что позволяет воспользоваться автоматизированным высокопроизводительным скринингом (HTS). См. Cree et al. (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404. Методика анализа вовлекает добавление одного реагента (CellTiter-Glo® Reagent) непосредственно к культивируемым клеткам. Это приводит к лизису клеток и генерированию люминесцентного сигнала в люциферазной реакции. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству присутствующего АТФ, которое прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток, присутствующих в

культуре. Данные можно регистрировать посредством люминометра или визуализирующего устройства с камерой CCD. Результат определения люминесценции выражают в качестве относительных световых единиц (RLU).

**[801]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело против B7-H4-лекарственное средство для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления предусматривается конъюгат антитело против B7-H4-лекарственное средство для применения в способе лечения. В некоторых вариантах осуществления предусматривается конъюгат антитело против B7-H4-лекарственное средство для применения для лечения B7-H4-положительной злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело против B7-H4-лекарственное средство для применения в способе лечения индивидуума, имеющего B7-H4-положительную злокачественную опухоль, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества конъюгата антитело против B7-H4-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, как описано ниже.

**[802]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению конъюгата антитело против B7-H4-лекарственное средство для производства или получения лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство предназначено для лечения B7-H4-положительной злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения B7-H4-положительной злокачественной опухоли, причем способ включает введение индивидууму, имеющему B7-H4-положительную злокачественную опухоль, эффективного количества лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, как описано ниже.

**[803]** В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения B7-H4-положительной злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму, имеющему такую B7-H4-положительную злокачественную опухоль, эффективного количества конъюгата антитело против B7-H4-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, как описано ниже.

**[804]** В некоторых вариантах осуществления B7-H4-положительная злокачественная опухоль представляет собой, например, рак молочной железы, рак эндометрия, рак яичника, немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточная карцинома), рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак почки (например, почечноклеточный рак), рак мочевого пузыря (например, карцинома из уротелиальных клеток), рак толстого



кишечника, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка, меланому, карциному желчных протоков, рак тела матки и холангиальную карциному.

**[805]** В некоторых вариантах осуществления В7-Н4-положительная злокачественная опухоль представляет собой, например, рак молочной железы, рак эндометрия, рак яичника или холангиальную карциному.

**[806]** В некоторых вариантах осуществления В7-Н4-положительный рак молочной железы представляет собой тройной негативный рак молочной железы, положительный по рецептору гормона/HER2 (-) (HR+/HER2 (-)) рак молочной железы или карциному протоков.

**[807]** В некоторых вариантах осуществления В7-Н4-положительный рак яичника представляет собой серозную аденокарциному яичника.

**[808]** В некоторых вариантах осуществления В7-Н4-положительный рак яичника представляет собой высокозлокачественный серозный рак яичника. В некоторых вариантах осуществления высокозлокачественный серозный рак яичника представляет собой рак фаллопиевой трубы или первичную перитонеальную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак фаллопиевой трубы или первичный перитонеальный рак является метастазирующим. В некоторых вариантах осуществления рак фаллопиевой трубы или первичный перитонеальный рак является рецидивирующим.

**[809]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения тройного негативного рака молочной железы у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании, или его фармацевтической композиции.

**[810]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения HR+/HER2 (-) рака молочной железы у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании, или его фармацевтической композиции.

**[811]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака эндометрия у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании, или его фармацевтической композиции.

**[812]** В некоторых вариантах осуществления индивидууму с тройным негативным раком молочной железы индивидууму вводили перед лечением ингибитор топоизомеразы или его ADC, например, такой как сацитумаб говитекан; химиотерапевтическое средство, например, такое как доцетаксел, доксорубицин, циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, гемцитабин и цисплатин; антинеопластическое средство, например, такое как атезолизумаб; ингибитор АКТ, например, такой как ипатасертиб; ингибитор PARP, например, такой как олапариб (Линпарза), рупартиб (Рубра), талазопариб и нирапариб (Зеюла) или их комбинацию.

**[813]** В некоторых вариантах осуществления индивидууму с HR+/HER2 (-) раком молочной железы ранее проводилось лечение ингибитором циклин-зависимой киназы 4 и

6 (CDK4/6), например, таким как пальбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб; химиотерапевтическим средством, например, таким как доцетаксел, доксорубицин, циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, гемцитабин и цисплатин; ингибиторами ангиогенеза, например, такими как бевацизумаб (Авастин); антагонистом рецептора эстрогена, например, таким как фулвестрант (Фаслодекс); ингибитором mTOR, например, таким как эверолимус; ингибитором PI3K, например, таким как алпелисиб; или их комбинацией.

**[814]** В некоторых вариантах осуществления индивидууму с раком яичника субъект проводилось предшествующее лечение химиотерапевтическим средством, например, таким как доцетаксел, доксорубицин, циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, гемцитабин и цисплатин; ингибиторами ангиогенеза, например, такими как бевацизумаб (Авастин); ингибитор PARP, например, такой как нирапариб (Зеюла), олапариб (Линпарза) и велипариб; олапариб (Линпарза) в комбинации с бевацизумабом; или их комбинация.

**[815]** В некоторых вариантах осуществления индивидууму с раком эндометрия проводилось предшествующее лечение химиотерапевтическим средством, например, таким как доцетаксел, доксорубицин, циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, гемцитабин и цисплатин; прогестином, например, таким как медроксипрогестерона ацетат (Провера<sup>®</sup>) и магестрола ацетат (Мегейс); антиэстрогенное лекарственное средство, например, такое как тамоксифен; агонист релизинг-фактора лютеинизирующего гормона (агонист LHRH), например, такой как гозерелин (Золадекс) и леупролид (Люпрон); ингибитор ароматазы, например, такой как лектрозол (Фемара), анастрозол (Аримидекс) и экземестан (Аромазин); ингибитор киназы, например, такой как Ленватини; ингибиторы ангиогенеза, например, такие как бевацизумаб (Авастин); ингибитор mTOR, например, такой как эверолимус (Афинитор); антитело против PD-1, например, такое как ниволумаб (ОПДИВО), пембролизумаб (КИТРУДА), MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493), камрелизумаб (SHR-1210), тислелизумаб (BGB-A317) и спартализумаб (NPVPDR001, NVS240118, PDR001) или их комбинация.

**[816]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у индивидуума, который недостаточно отвечает на ингибитор PD-1/PD-L1, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании, или его фармацевтической композиции.

**[817]** Индивидуум со злокачественной опухолью, который недостаточно отвечает на ингибитор PD-1/PD-L1, мог ранее отвечать на ингибитор PD-1/PD-L1, но стать менее отвечающим на ингибитор PD-1/PD-L1, или злокачественная опухоль могла никогда не отвечать на ингибитор PD-1/PD-L1. Недостаточный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1 означает что аспекты злокачественной опухоли, улучшение которых ожидалось после стандартной дозы ингибитора PD-1/PD-L1, не улучшаются и/или улучшение происходит только при введении дозы, превышающей стандартную. В некоторых вариантах осуществления индивидуум со злокачественной опухолью, который недостаточно отвечает

на ингибитор PD-1/PD-L1, имел или имеет недостаточный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1 после введения стандартной дозы в течение по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель, по меньшей мере четырех недель, по меньшей мере шести недель или по меньшей мере двенадцати недель. "Стандартную" дозу определяет медицинский специалист, и она может зависеть от возраста индивидуума, массы тела, медицинского анамнеза, тяжести заболевания, частоты дозирования и т.д. В некоторых вариантах осуществления индивидуум со злокачественной опухолью, который недостаточно отвечает на ингибитор PD-1/PD-L1, имел или имеет недостаточный ответ на антитело против PD-1 и/или антитело против PD-L1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум со злокачественной опухолью, который недостаточно отвечает на ингибитор PD-1/PD-L1, имел или имеет недостаточный ответ на AMP-224. В некоторых вариантах осуществления индивидуум со злокачественной опухолью, который недостаточно отвечает на ингибитор PD-1/PD-L1, имел или имеет недостаточный ответ на ингибитор PD-1/PD-L1, выбранный из ниволумаба, пембролизумаба и атезолизумаба.

**[818]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует низкий уровень PD-L1, включающему введение индивидууму эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем описании, или его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль, которая экспрессирует "низкий уровень PD-L1" или экспрессирует "PD-L1 на низком уровне", означает, что уровень PD-L1 ниже, чем уровень экспрессии в злокачественной опухоли, для которой показано лечение антагонистом PD-1 или PD-L1, где индивидуумов выбирают для лечения на основе уровней экспрессии PD-L1. В некоторых вариантах осуществления "низкий уровень PD-L1" представляет собой уровень, при котором менее 1% клеток в опухоли имеют окрашивание мембраны. В некоторых вариантах осуществления "низкий уровень" в отношении PD-L1 представляет собой окрашивание менее 1%, например, окрашивается 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1% или 0% клеток опухоли. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии PD-L1 могут быть измерены посредством хромогенной ИНС или иммунофлуоресцентной ИНС (Aqua scoring). В определенных вариантах осуществления окрашивание PD-L1 5% или менее (включая опухолевые и/или иммунные клетки) может указывать на то, что образец экспрессирует "низкий уровень PD-L1". В определенных вариантах осуществления окрашивание PD-L1 10% или менее (включая опухолевые и/или иммунные клетки) может указывать на то, что образец экспрессирует "низкий уровень PD-L1". Если в настоящем описании нет иных указаний, в настоящем описании используется пороговое значение 5% (т.е. 5% или менее указывают на "низкий уровень PD-L1").

**[819]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат, описанный в настоящем описании, или его фармацевтическую композицию вводят индивидууму, у которого диагностирована злокачественная опухоль, для усиления пролиферации Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток у пациента. В другом варианте осуществления конъюгат, описанный в настоящем описании, или его фармацевтическую композицию вводят

индивидууму, у которого диагностирована злокачественная опухоль, для усиления продуцирования интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ) у индивидуума. В другом варианте осуществления конъюгат, описанный в настоящем описании, или его фармацевтическую композицию вводят индивидууму, у которого диагностирована злокачественная опухоль, для блокирования ингибиторной активности B7-H4 в отношении Т-клеток у индивидуума. В другом варианте осуществления конъюгат, описанный в настоящем описании, или его фармацевтическую композицию вводят индивидууму, у которого диагностирована злокачественная опухоль, для истощения экспрессирующих B7-H4 злокачественных клеток у индивидуума.

**[820]** В некоторых вариантах осуществления конъюгат, описанный в настоящем описании, или его фармацевтическую композицию вводят индивидууму, как описано выше, и, кроме того, в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, например, антагонистом PD-1; антагонистом PD-L1; ингибитором топоизомеразы или его ADC, например таким как сацитузумаб говетикан; химиотерапевтическим средством, например, таким как доцетаксел, доксорубин, циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, гемцитабин и цисплатин; антинеопластическим средством, например, таким как атезолизумаб; ингибиторами ангиогенеза, например, такими как бевацизумаб (Авастин); ингибитором АКТ, например, таким как ипатасертиб; ингибитором PARP, например, таким как олапариб (Линпарза), рупапариб (Рубрака), талазопариб и нирапариб (Зеюла); ингибитором циклин-зависимой киназы 4 и 6 (CDK4/6), например, таким как пальбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб; селективным антагонистом рецептора эстрогена, например, таким как фулвестрант (Фаслодекс); ингибитором mTOR, например, таким как эверолимус (Афинитор); ингибитором PI3K, например, таким как алпелисиб; или их комбинацией.

**[821]** В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой антагонист PD-1, такой как антитело-антагонист PD-1. Подходящие антитела против PD-1 включают, например, ниволумаб (ОПДИВО), пембролизумаб (КИТРУДА), MEDI-0680 (AMP-514; WO2012/145493), камрелизумаб (SHR-1210), тислелизумаб (BGB-A317) или спартализумаб (NPVPDR001, NVS240118, PDR001). Дополнительное терапевтическое средство также может включать пидилизумаб (CT-011). Также в качестве антагониста рецептора PD-1 используют рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224.

**[822]** В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 представляет собой антитело-антагонист PD-L1. Подходящие антитела против PD-L1 включают, например, атезолизумаб (ТЕЦЕНТРИК), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO2007/005874), авелумаб (WO2013/79174) или rHigM12B7.

**[823]** В некоторых вариантах осуществления, например, когда злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль Her2, дополнительное терапевтическое средство представляет собой трастузумаб, Трастузумаб эмтанзин

(Кадсила®) пертузумаб (Перьета®), ингибиторы тирозинкиназы, например, такие как лапатиниб и тукатиниб.

**[824]** Такие комбинированные способы терапии, описанные выше, охватывают комбинированное введение (где два или более терапевтических средств включены в один и тот же или в разные составы), и введение по отдельности, в случае которого введение антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Конъюгаты антитело против В7-Н4-лекарственное средство по изобретению также могут использоваться в комбинации с лучевой терапией.

**[825]** Специалист в данной области способен определить точные количества активных веществ, включая конъюгаты антитело против В7-Н4-лекарственное средство, для введения индивидууму. Например, такие средства и применения для лечения злокачественных опухолей и солидных опухолей хорошо известны в данной области. Таким образом, дозировки таких средств могут быть выбраны на основе стандартных режимов дозирования этого средства для данного пути введения.

**[826]** Понятно, что точная дозировка и длительность лечения зависят от ткани или опухоли, подвергаемых лечению, и они могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов тестирования или посредством экстраполирования из данных тестирования *in vivo* или *in vitro*, и/или могут быть определены из известных режимов дозирования конкретного средства. Следует отметить, что концентрации и дозировки также могут варьироваться в зависимости от возраста подвергаемого лечению индивидуума, массы тела индивидуума, пути введения и/или степени или тяжести заболевания или других факторов, которые способен учитывать квалифицированный медицинский специалист. Как правило, режимы дозирования выбирают для ограничения токсичности. Следует отметить, что лечащему врачу известно, как и когда завершить, прервать или скорректировать терапию до более низкой дозировки вследствие токсичности или дисфункции костного мозга, печени или почек, или других тканей. Напротив, лечащему врачу также известно, как и когда скорректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ является недостаточным (избегая токсических побочных эффектов). Кроме того, понятно, что для любого конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования следует корректировать с течением времени в соответствии с потребностями индивидуума и профессиональным мнением индивидуума, осуществляющего введение или контролирующего введение составов, и что диапазоны концентраций, приведенные в настоящем описании, являются только иллюстративным и не предназначены для ограничения его объема.

**[827]** Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в области, к которой относится настоящее изобретения. В настоящем описании форма единственного числа также включает множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и

материалам, описанным в настоящем описании, могут быть использованы для применения на практике или тестирования настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, имеет преимущество. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

**[828]** На протяжении описания, где соединения, каркасы и композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, предусматривается, что композиции также состоят по существу из или состоят из указанных компонентов. Аналогично, когда способы или процессы описаны как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии процесса, процессы также состоят по существу из или состоят из указанных стадий процесса. Кроме того, следует понимать, что порядок стадий или порядок проведения определенных действий является несущественным при условии, что изобретение остается функциональным. Более того, две или более стадий или действий могут быть проведены одновременно.

**[829]** Все способы, описанные в настоящем описании, можно выполнять в любом порядке, если в настоящем описании нет иных указаний или если контекст этому явно не противоречит. Применение любых и всех примеров или иллюстрирующей формулировки (например, "такой как") в настоящем описании предназначено только для лучшей иллюстрации изобретения, и его не следует истолковывать как ограничение объема формулы изобретения, если явно не заявлено иное. Никакую формулировку в описании не следует истолковывать как указывающую на то, что какой-либо не заявленный в формуле изобретения элемент является необходимым для того, что заявлено.

#### ПРИМЕРЫ

**[830]** Приведенные ниже рабочие примеры иллюстрируют линкеры, молекулы лекарственного средства и антитела или фрагменты антител, и способы их получения. Они не предназначены для ограничения, и специалисту в данной области будет хорошо понятно, что можно использовать другие реагенты или способы.

#### Сокращенные обозначения

**[831]** Приведенные ниже сокращенные обозначения используются на схемах реакции и в примерах синтеза, которые следуют далее. Подразумевается, что этот перечень не является исчерпывающим перечнем сокращенных обозначений, использованных в заявке, поскольку на схемах синтеза и в примерах могут использоваться дополнительные стандартные сокращенные обозначения, которые хорошо понятны специалистам в области органического синтеза.

#### Сокращенные обозначения:

ACN: ацетонитрил

AF: ауристатин F

AF-NPA: ауристатин F гидроксипропиламид

водн.: водный

СЕ: капиллярный электрофорез

CR: полная регрессия  
 DAD: детектор на диодной матрице  
 DAR: соотношение лекарственного средства и антитела  
 DMEM: модифицированная способом Дульбекко среда Игла  
 ELISA: твердофазный иммуноферментный анализ  
 Endo SH: эндогликозидаза SH  
 FBS: эмбриональная телячья сыворотка  
 Fuc: фукоза  
 GalNAcT: гликозилтрансфераза  
 HIC: хроматография гидрофобного взаимодействия  
 HRP: пероксидаза хрена  
 в/в: внутривенный  
 LC: жидкостная хроматография  
 MS: масс-спектрометрия  
 MTV: срединный объем опухоли  
 ЯМР: ядерно-магнитный резонанс  
 PBS: фосфатно-солевой буфер  
 PBST: фосфатно-солевой буфер, содержащий Tween  
 PR: частичная регрессия  
 ОФ-ВЭЖХ: обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография  
 SEC: эксклюзионная хроматография  
 TFS: безопухолевая выживаемость  
 TGI: ингибирование роста опухоли  
 TCEP: трис[2-карбоксиэтил]фосфин  
 TEAA: ацетат триэтиламмония  
 TMB: тетраметилбензидин  
 UDP: уридиндифосфат  
 UF/DF: ультрафильтрация/диафильтрация  
 WCX: слабая катионообменная хроматография  
 Общая информация

**[832]** Все реагенты приобретались у соответствующих поставщиков, если нет иных указаний.

**[833]** Родительское антитело B7-H4\_2F9 (антитело против B7-H4) и 2A7 описаны в US 2011/0085970 A1. Антитело 1D11 описано в US20160159910A1. Endo SH получали, как описано в заявке PCT WO 2017137459, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. UDP-азидосахар и GalNAcT получали, как описано в US 9988662, полное содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки.

**[834]** Агонист STING diABZI получали, как описано в Ramanjulu et al (Nature, 564(7736):439-443 (2018)).

**[835]** Ингибирование роста опухоли (%TGI) определяли как процентное отличие

срединных объемов опухоли (MTV) между подвергнутой лечению и контрольной группами. Размер опухоли определяли в каждом испытании эффективности для определения ингибирования роста опухоли (TGI).

**[836]** Когда это было применимо, содержание лекарственного средства в конъюгатах определяли спектрофотометрически, в остальных случаях для количественного определения содержания лекарственного средства проводили ОФ-ВЭЖХ или LC/MS.

**[837]** Содержание белка в конъюгатах антитело-лекарственное средство определяли спектрофотометрически или посредством ELISA.

**[838]** Конъюгаты антитело-лекарственное средство, несущие лекарственное средство каркасы или антительные каркасы, очищали (т.е. удаление остаточного не вступившего в реакцию лекарственного средства, неконъюгированного антитела, ферментов или исходных материалов) посредством экстенсивной диафильтрации, хроматографии СНТ или НИС, при необходимости. При необходимости проводили дополнительную очистку посредством SEC или НИС для удаления агрегированных конъюгатов антитело-лекарственное средство. Как правило, конъюгаты антитело-лекарственное средство после очистки содержали <5% (масс./масс.) (например, <2% (масс./масс.)) агрегированных конъюгатов антитело-лекарственное средство при определении посредством SEC; <0,5% (масс./масс.) (например, <0,1% (масс./масс.)) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства при определении посредством ОФ-ВЭЖХ и/или LC-MS/MS; <1% (масс./масс.) свободного конъюгата лекарственного средства при определении посредством SEC и/или ОФ-ВЭЖХ; и <10% (масс./масс.) (например, <1% (масс./масс.)) неконъюгированного антитела или фрагментов антител при определении посредством НИС-ВЭЖХ и/или ОФ-ВЭЖХ. Восстановленные или частично восстановленные антитела получали с использованием методик, описанных в литературе, см., например, Francisco et al., Blood 102 (4): 1458-1465 (2003). Общую концентрацию лекарственного средства (конъюгированного и неконъюгированного) определяли посредством спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра или ОФ-ВЭЖХ.

**[839]** Для определения концентрации свободного лекарственного средства AF-НРА в биологическом образце подкисленный образец обрабатывали ACN. Свободное лекарственное средство экстрагировали и анализировали супернатант ACN. Для определения концентрации конъюгированного AF-НРА в неклиническом образце образец подвергали иммунному захвату с использованием покрытых IgG1-антителом магнитных микроносителей с последующим исчерпывающего основного гидролиза. Супернатант ACN, содержащий высвободившееся лекарственное средство AF-НРА, анализировали посредством LC-MS/MS. Общую концентрацию антитела в неклинических образцах определяли посредством LC-MS/MS после иммунного захвата с использованием антитела против IgG1 посредством детекции пептидной последовательности, уникальной для антитела, после триптического расщепления. Для клинических образцов можно было следовать той же методике, за исключением того, что для иммунного захвата нужно было использовать антиидиотипическое антитело во избежание препятствования со стороны



эндогенных антител.

**[840]** Анализ сводного AF и AF-НРА проводили посредством ОФ-ВЭЖХ с использованием колонки C4, градиента ACN и УФ-детекции. Площади пиков интегрировали и сравнивали со стандартами AF и AF-НРА. Способ является количественным для AF и AF-НРА в плазме и гомогенатах тканей и линейным на протяжении диапазонов концентраций от 0,1 нг/мл до 150 нг/мл. Общее лекарственное средство (AF-НРА), высвободившееся после гидролиза NaOH (водн.) определяли в тех же условиях с динамическим диапазоном от 1 нг/мл до 5000 нг/мл. Общие стандарты антител имели в диапазон от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл.

**[841]** Гидрофобность конъюгата антитело-лекарственное средство определяли посредством НИС-ВЭЖХ на системе ВЭЖХ Shimadzu Prominence, оборудованной DAD. Для этого анализа колонку TSK gel butyl-NPR (размер частиц 2,5 мкм) держали при 35°C. Подвижная фаза А представляла собой 1,5 М сульфат аммония, 25 мМ фосфат натрия, pH 7,0, и подвижная фаза В представляла собой 25 мМ фосфат натрия, 10% изопропиловый спирт, pH 7,0. Разделение проводили посредством линейного градиента 0-100% подвижной фазы В в течение 25 минут. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Инжектирование образцов происходило в диапазоне от ~10 мкг до 100 мкг.

**[842]** Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) для конъюгатов, содержащих часть цитотоксического лекарственного средства, определяли путем проведения для конъюгатов антитело-лекарственное средство исчерпывающего основного гидролиза. Затем высвободившийся AF-НРА количественно определяли из стандартной кривой посредством ОФ-ВЭЖХ. Измеренные концентрации AF-НРА сопоставляли с содержанием антитела для определения DAR.

**[843]** Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) для конъюгатов, содержащих часть лекарственного средства-агониста STING, определяли путем определения поглощения конъюгатов. Величину DAR вычисляли с использованием соответствующих коэффициентов молярной экстинкции антитела и груза-агониста STING.

**[844]** Опухоли измеряли два раза в неделю с использованием цифрового штангенциркуля с использованием формулы: объем опухоли (мм<sup>3</sup>)=(ширина<sup>2</sup> × длина)/2. Массу тела регистрировали каждые сутки в течение первой недели после этого два раза в неделю. Животные оставались в испытании до тех пор, пока индивидуальный объем опухоли не достигал  $\geq 1000 \text{ мм}^3$ ,  $\geq 1500 \text{ мм}^3$  или как указано. Процентное изменение массы тела вычисляли с использованием формулы: изменение массы тела (%)=((масса<sup>сутки испытания</sup> X - масса<sup>сутки испытания 1</sup>)/масса<sup>сутки испытания 1</sup>) \* 100. Объемы опухоли сообщались как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения (SEM). Ингибирование роста опухоли (%TGI) определяли как процентную разность между средними объемами опухоли (MTV) между группой введения и контрольной группой. Размер опухоли измеряли в каждом испытании эффективности для определения ингибирования роста опухоли (TGI). Процентную регрессию опухоли вычисляли с использованием формулы: % регрессия=(1-(средний объем опухоли<sup>конечный</sup>)/(средний объем опухоли<sup>сутки 1</sup>)) \* 100.

**[845]** Для испытаний с ксенотрансплантатами ответы в виде регрессии для индивидуальных животных классифицировали на две категории. Частичный ответ (PR) определяют как объем опухоли 50% или менее на 1 сутки для трех последовательных измерений и ровно или более 13,5 мм<sup>3</sup> для по меньшей мере одного из этих трех показателей. Полный ответ (CR) определяют как объем опухоли менее 13,5 мм<sup>3</sup> для трех измерений подряд. Выживаемость без опухоли (TFS) классифицируют как наличие CR в конце испытания. Животных оценивали только один раз в ходе испытания в отношении события PR или CR, и оценивали как CR, только если удовлетворялись критерии обоих из PR и CR. Животное с ответом CR после завершения испытания, кроме того, классифицировали как свободное от опухоли выжившее животное (TFS).

**[846]** Для испытаний PDX ответы с точки зрения регрессии для индивидуальных животных классифицировали на категории:

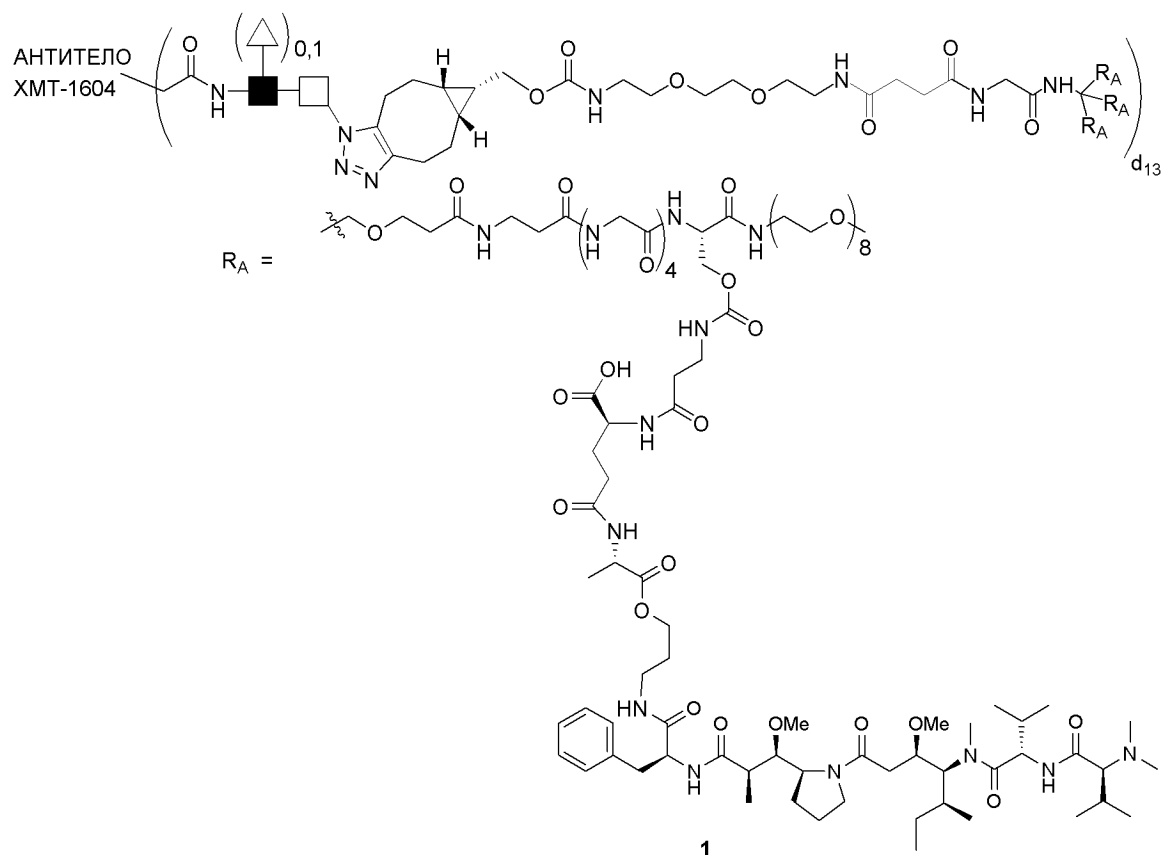
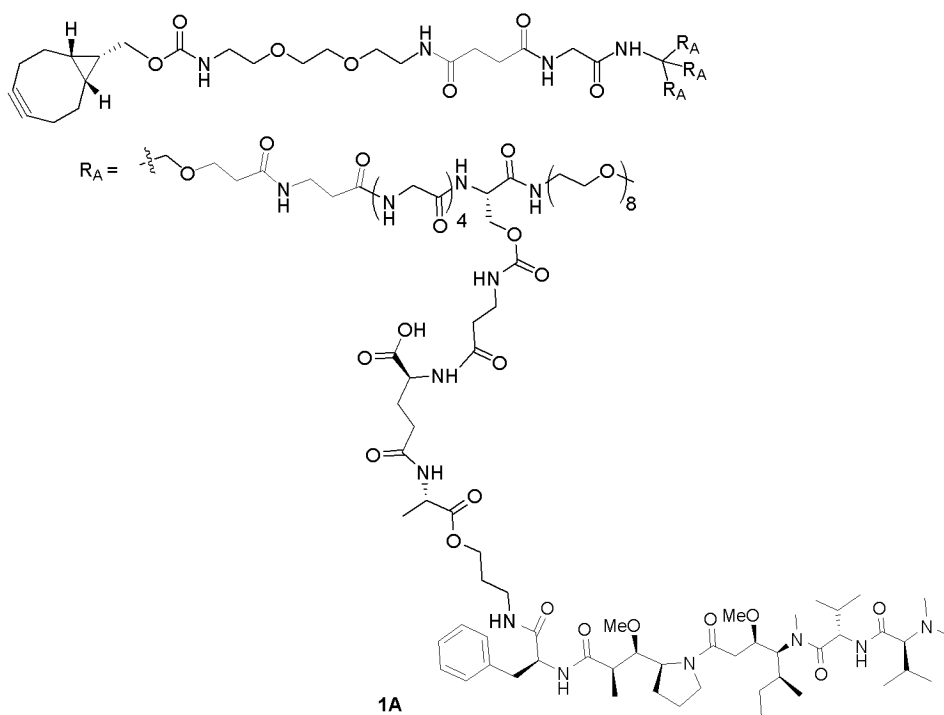
TS (стабилизация опухоли)=количество мышей, имеющих постоянный размер опухоли в ходе нескольких измерений подряд.

PR (частичная регрессия)=количество мышей, имеющих размер опухоли ниже первоначального размера опухоли в ходе нескольких измерений подряд.

CR (полная регрессия)=количество мышей, имеющих размер опухоли от 0 до 13 мм<sup>3</sup> в ходе нескольких измерений подряд.

TFS (свободные от опухоли выжившие)=количество полных регрессий, зарегистрированных вплоть до последнего дня для группы.

**Пример 1: Синтез конъюгата 1 XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18)-цитотоксическое лекарственное средство**



где  представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc и  представляет собой GalNAc.

*Стадия 1. Азидо-модифицированное антитело XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18)*

**[847]** К антителу XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (12,71 мг, 0,088 мкмоль) в 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, добавляли в указанном порядке: Endo SH (0,127 мг, 1 масс. %), GalNAcT (0,64 мг, 5 масс.%), UDP-азидосахар (1,34 мг, 2,12 мкмоль) и MnCl<sub>2</sub> (1,18 мг, 9,4 мкмоль) для достижения конечной концентрации антитела 13,5 г/л. Реакционную смесь перемешивали при 30 об/мин в течение 17 часов при 30°C. Неочищенное азидо-модифицированное антитело XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) очищали посредством хроматографии с белком А и диализа с получением азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (10,53 мг, выход 83%).

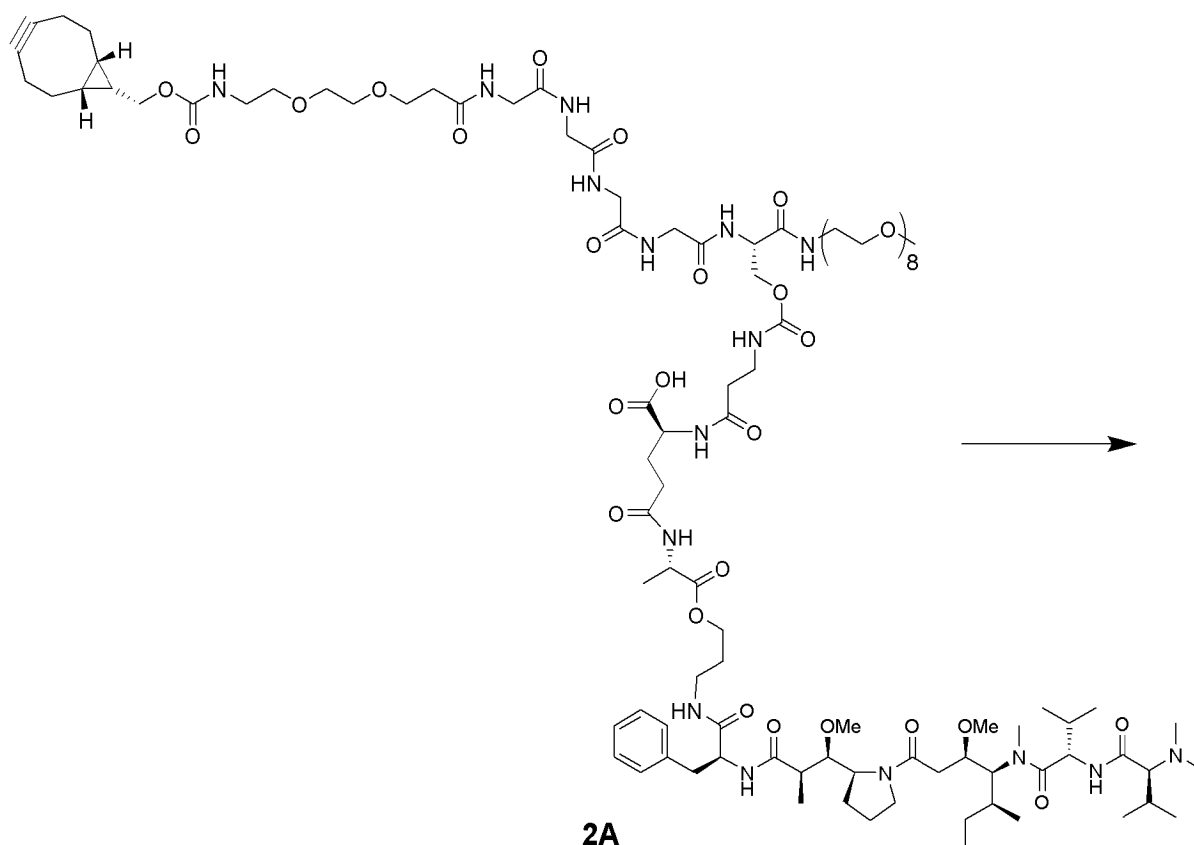
*Стадия 2. Конъюгат 1 лекарственного средства XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18)*

**[848]** Азидо-модифицированное антитело XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (10,03 мг, 0,070 мкмоль) в PBS, pH 7,2, и каркас **1A** (4,25 мг, 0,67 мкмоль, полученный, как описано в US 17/144378) в воде осторожно перемешивали, а затем оставляли на 20 часов при 30°C без встряхивания или качания. Неочищенный продукт очищали посредством UF/DF и HIC с получением конъюгата **1-1** (5,85 мг, выход 58%), который имел DAR 5,9 при определении с использованием ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

**[849]** Ниже приведены детали для конъюгатов **1-1**, **1-2** и **1-3**

| Конъюгат             | DAR |
|----------------------|-----|
| 1-1<br>XMT-1604 (K+) | 5,9 |
| 1-2                  | 5,9 |
| 1-3                  | 5,8 |

**Пример 2: Синтез конъюгата 2 XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18)-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 2,0**

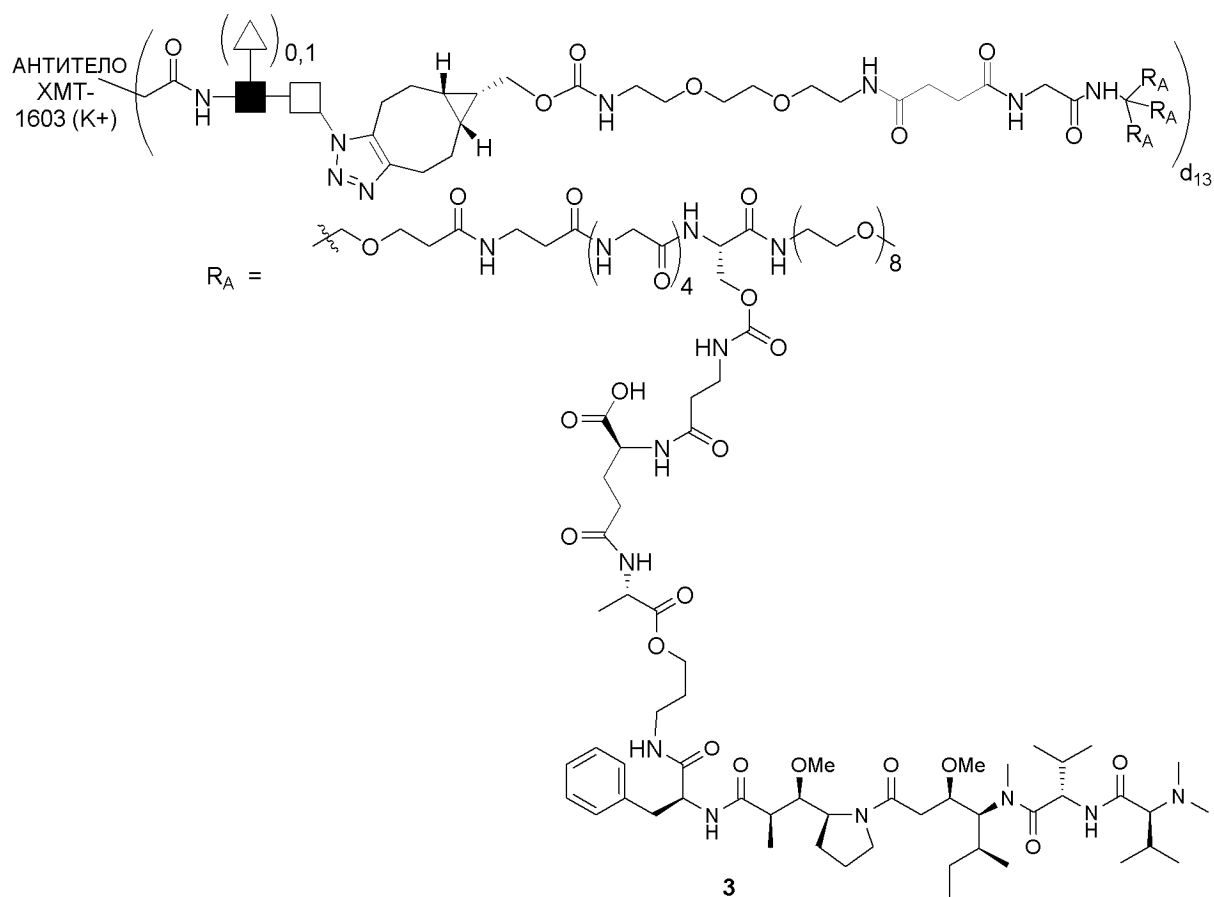


где ■ представляет собой GlcNAc; △ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

**[850]** Конъюгат **2** синтезировали, как описано в примере 1, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (50 мг, 0,346 мкмоль) и каркас **2A** (7,12 мг, 3,34 мкмоль) вместо каркаса **1A**. Очищенный конъюгат **2** (30,1 мг, выход 60%) имел DAR 2,0 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением. Ниже приведены детали конъюгатов **2-1** и **2-2**.

| Конъюгат | DAR |
|----------|-----|
| 2-1      | 2,0 |
| 2-2      | 2,0 |

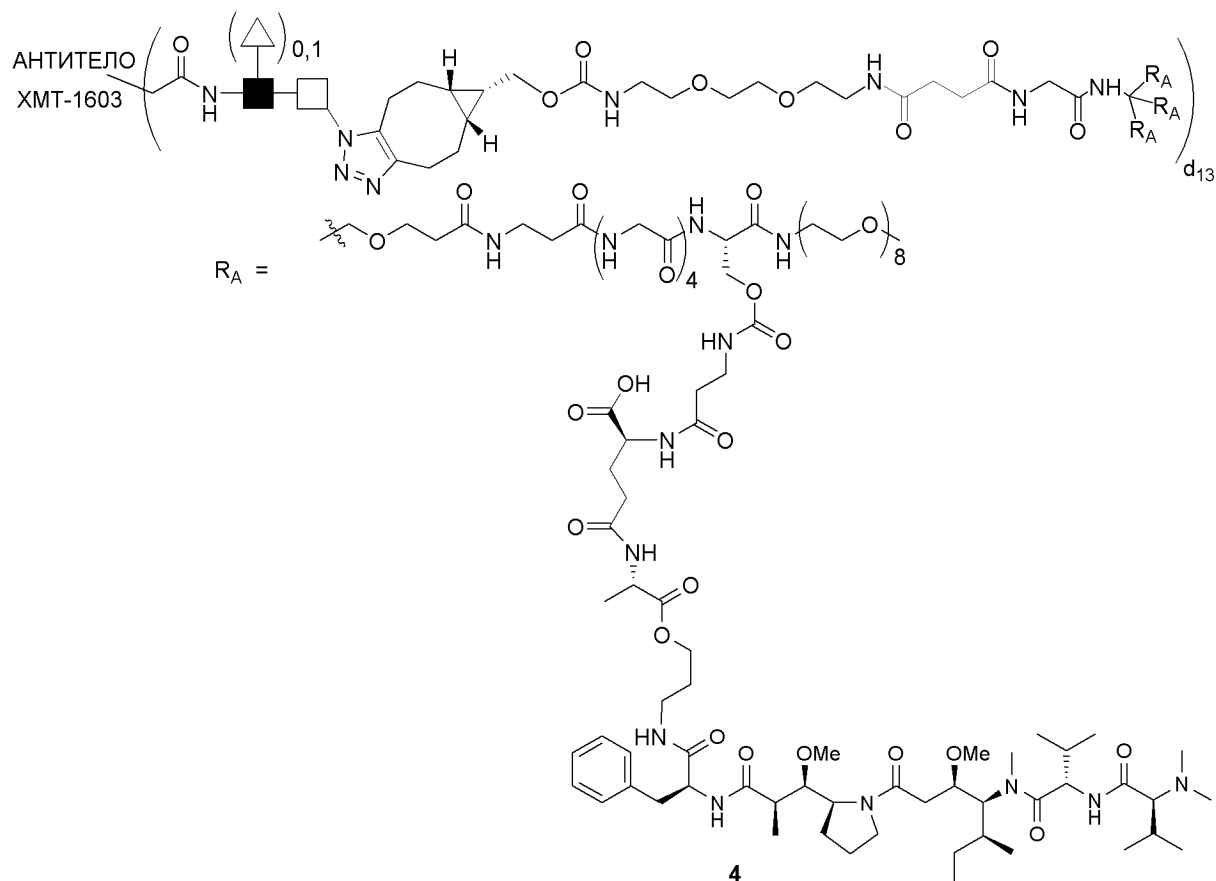
**Пример 3: Синтез конъюгата 3 XMT-1603 (K+) (B7-H4\_2F9V7)-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,9**



где  $\blacksquare$  представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc; и  $\square$  представляет собой GalNAc.

**[851]** Конъюгат **3** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело XMT-1603 (K<sup>+</sup>) (B7-H4\_2F9V7) (13,7 мг, 0,095 мкмоль, полученное, как описано в примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **3** (8,8 мг, выход 64%) имел DAR 5,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

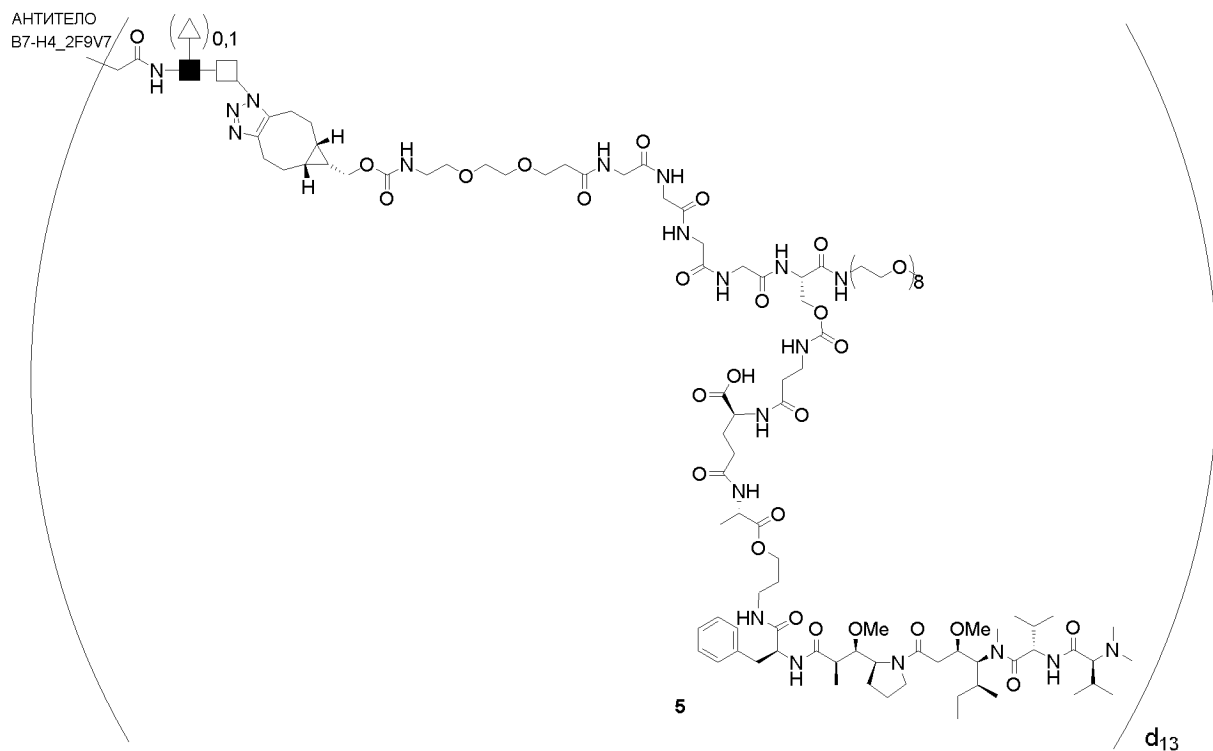
**Пример 4: Синтез конъюгата 4 XMT-1603 (B7-H4\_2F9V7)-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,9**



где  $\blacksquare$  представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc; и  $\square$  представляет собой GalNAc.

**[852]** Конъюгат **4** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии 3 использовали азидо-модифицированное антитело XMT-1603 (B7-H4\_2F9V7) (22 мг, 0,153 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **4** (13,8 мг, выход 63%) имел DAR 5,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

**Пример 5: Синтез конъюгата 5 цитотоксического лекарственного средства XMT-1603 (B7-H4\_2F9V7), DAR 1,9**

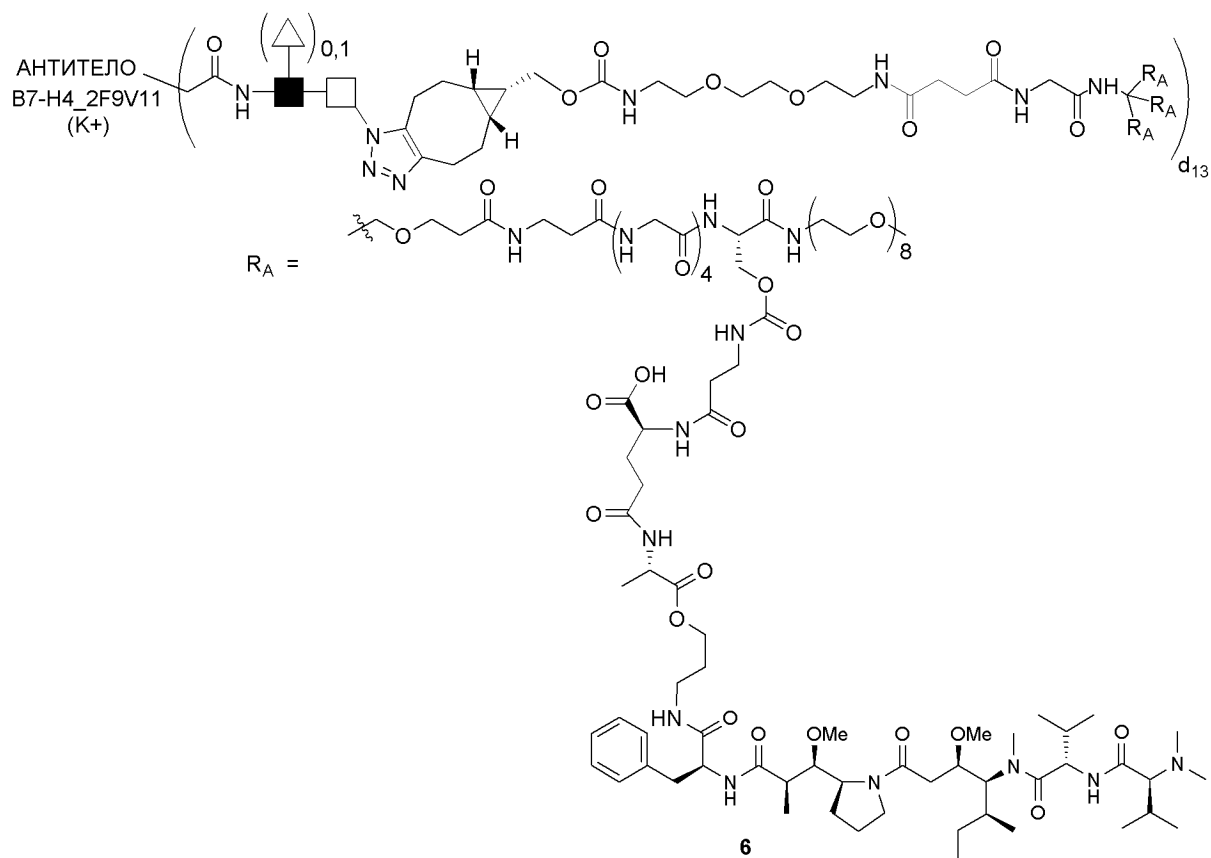


где ■ представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

**[853]** Конъюгат **5** синтезировали, как описано в Примере 2, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело XMT-1603 (B7-H4\_2F9V7) (50 мг, 0,347 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **5** (30,5 мг, выход 61%) имел DAR 1,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

**Пример 6: Синтез конъюгата 6 B7-H4\_2F9V11 (K+)-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,9**

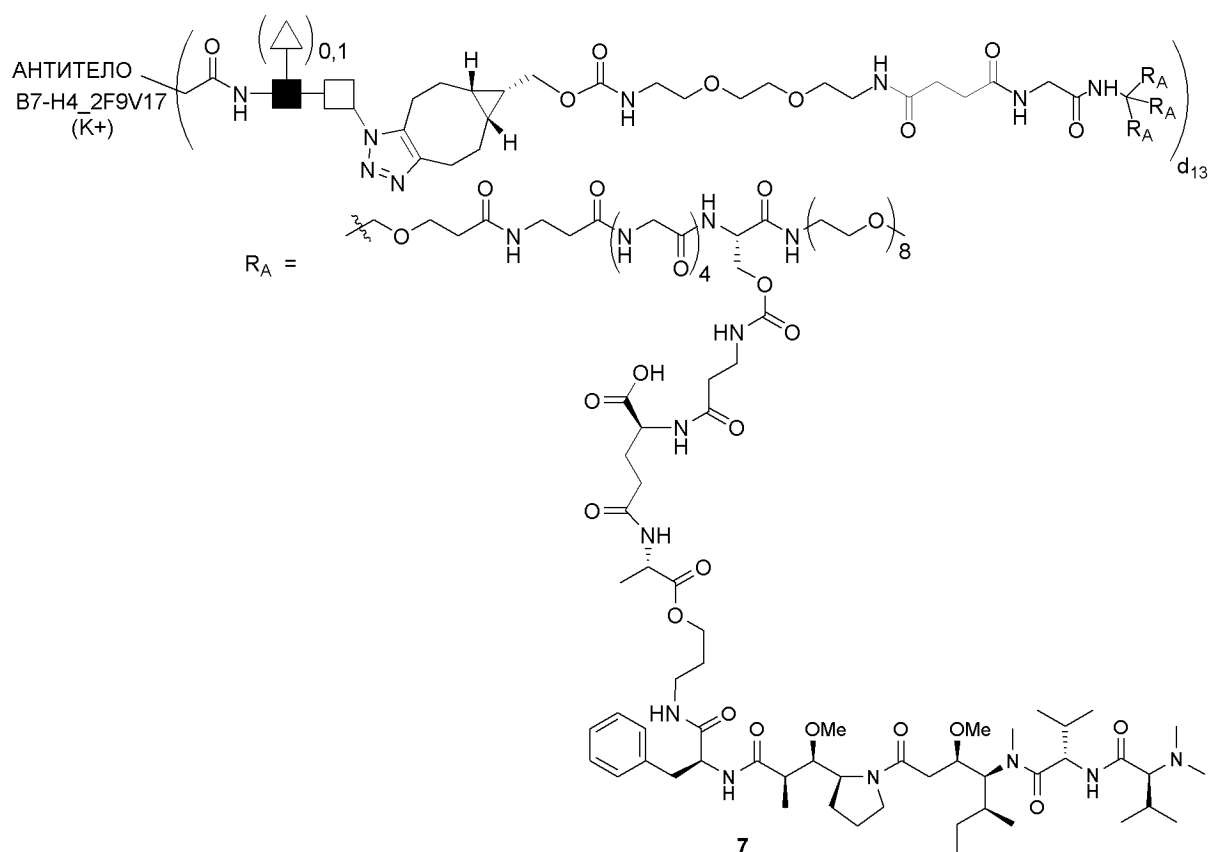




где  $\blacksquare$  представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc; и  $\square$  представляет собой GalNAc.

**[854]** Конъюгат **6** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело B7-H4\_2F9V11 (K+) (16,66 мг, 0,116 мкмоль, полученное, как описано в примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **6** (10,75 мг, выход 65%) имел DAR 5,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

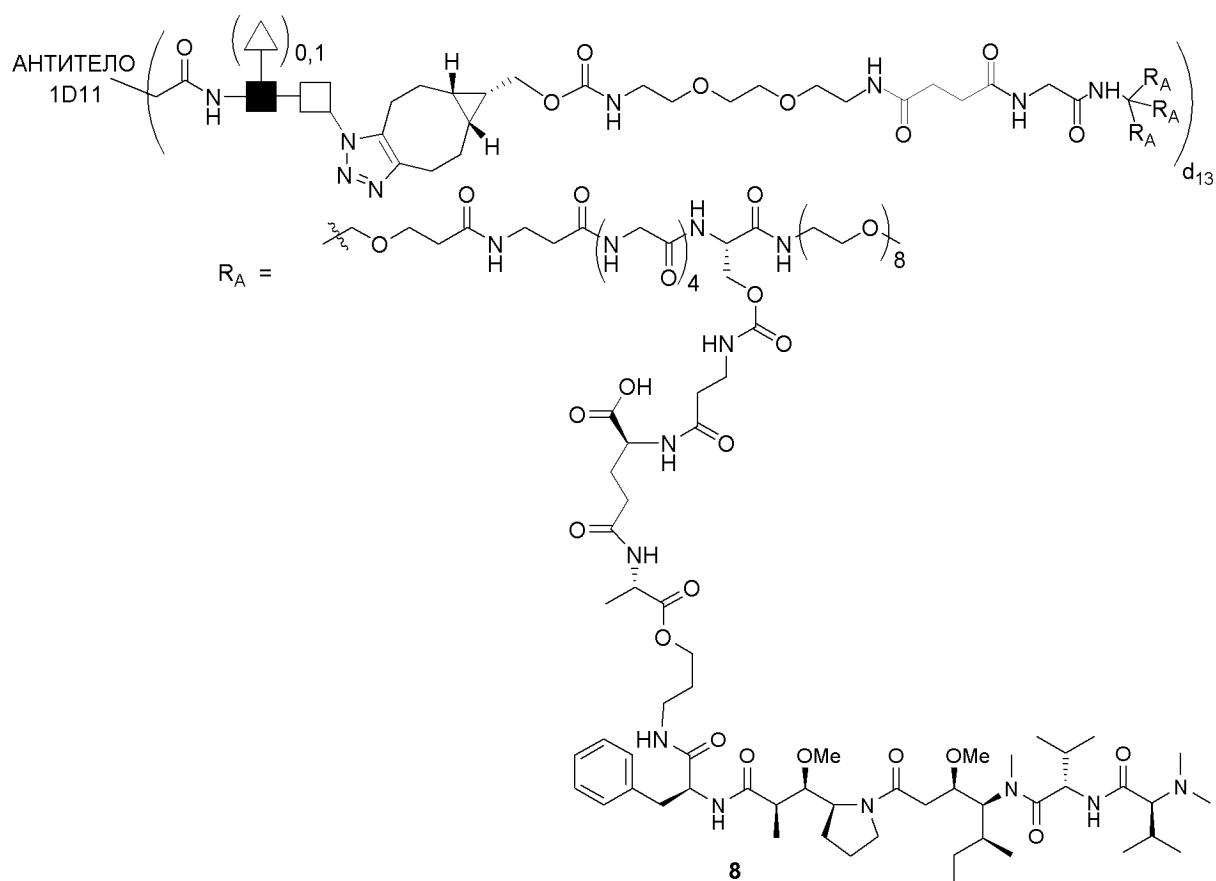
**Пример 7: Синтез конъюгата 7 B7-H4\_2F9V17 (K+)-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,9**



где ■ представляет собой GlcNAc;  $\Delta$  представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

**[855]** Конъюгат **7** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии использовали азидо-модифицированное антитело B7-H4\_2F9V17 (K<sup>+</sup>) (13,62 мг, 0,094 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **7** (8,1 мг, выход 59%) имел DAR 5,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

**Пример 8: Синтез конъюгата 8 1D11-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,8**

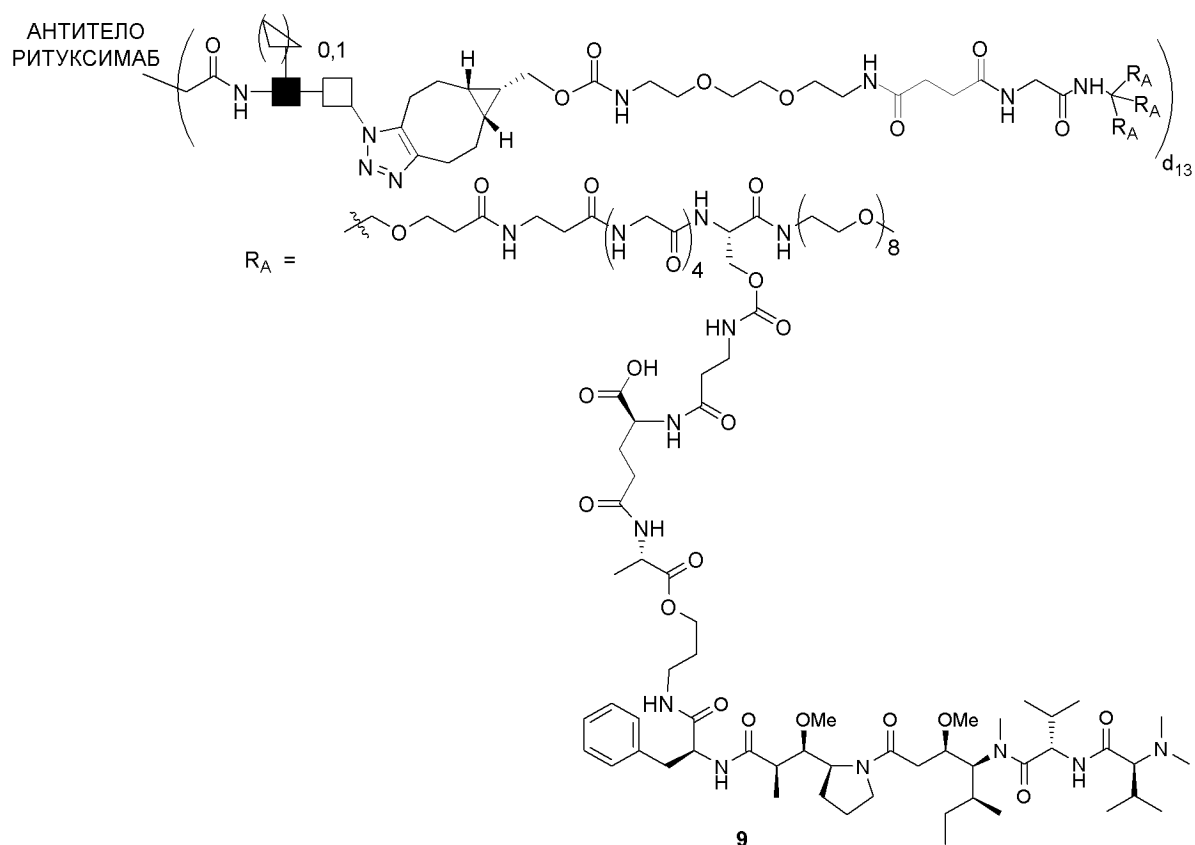


где ■ представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

**[856]** Конъюгат **8** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело 1D11 (15 мг, 1,04 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18. В таблице ниже приводятся детали очищенных конъюгатов 8-1 и 8-2.

| Конъюгат | DAR |
|----------|-----|
| 8-1      | 5,9 |
| 8-2      | 6,0 |

**Пример 9: Синтез конъюгата 9 ритуксимаб-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,7**

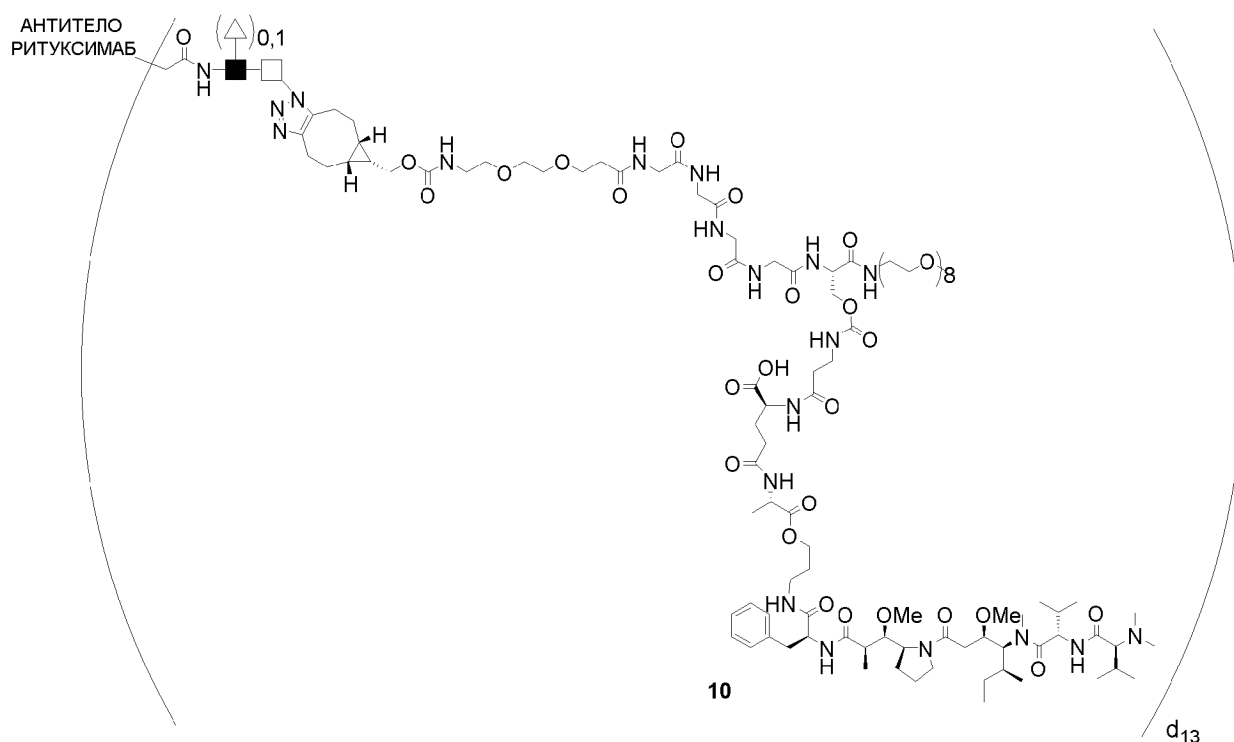


где ■ представляет собой GlcNAc;  $\Delta$  представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

[857] Конъюгат **9** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело ритуксимаб (131,4 мг, 0,91 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). В таблице ниже приведены детали очищенных конъюгатов **9-1** и **9-2**.

| Конъюгат | DAR |
|----------|-----|
| 9-1      | 5,7 |
| 9-2      | 5,9 |

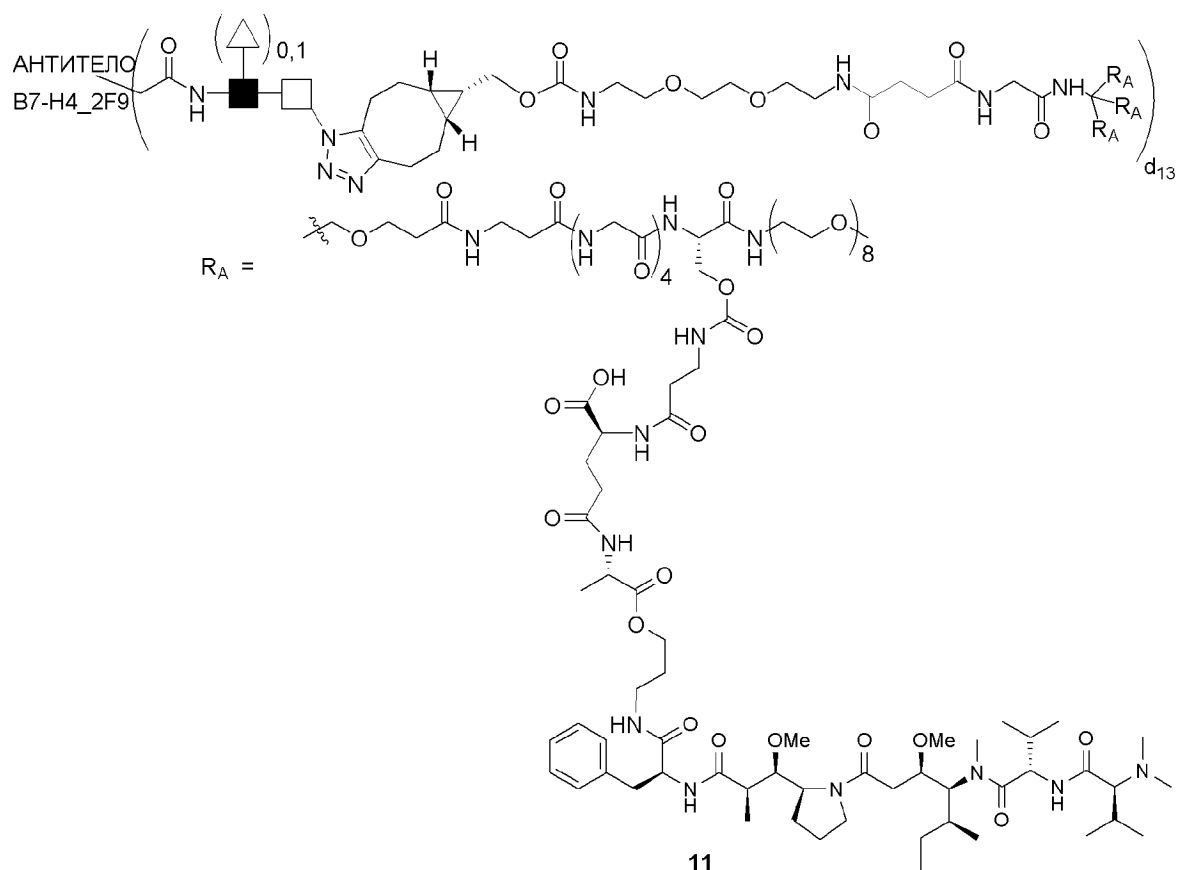
**Пример 10: Синтез конъюгата 10 ритуксимаб-цитотоксическое лекарственное**



где ■ представляет собой GlcNAc; △ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

**[858]** Конъюгат **10** синтезировали, как описано в Примере 2, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированное антитело ритуксимаб (35 мг, 0,242 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **10** (24 мг, выход 69%) имел DAR 1,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

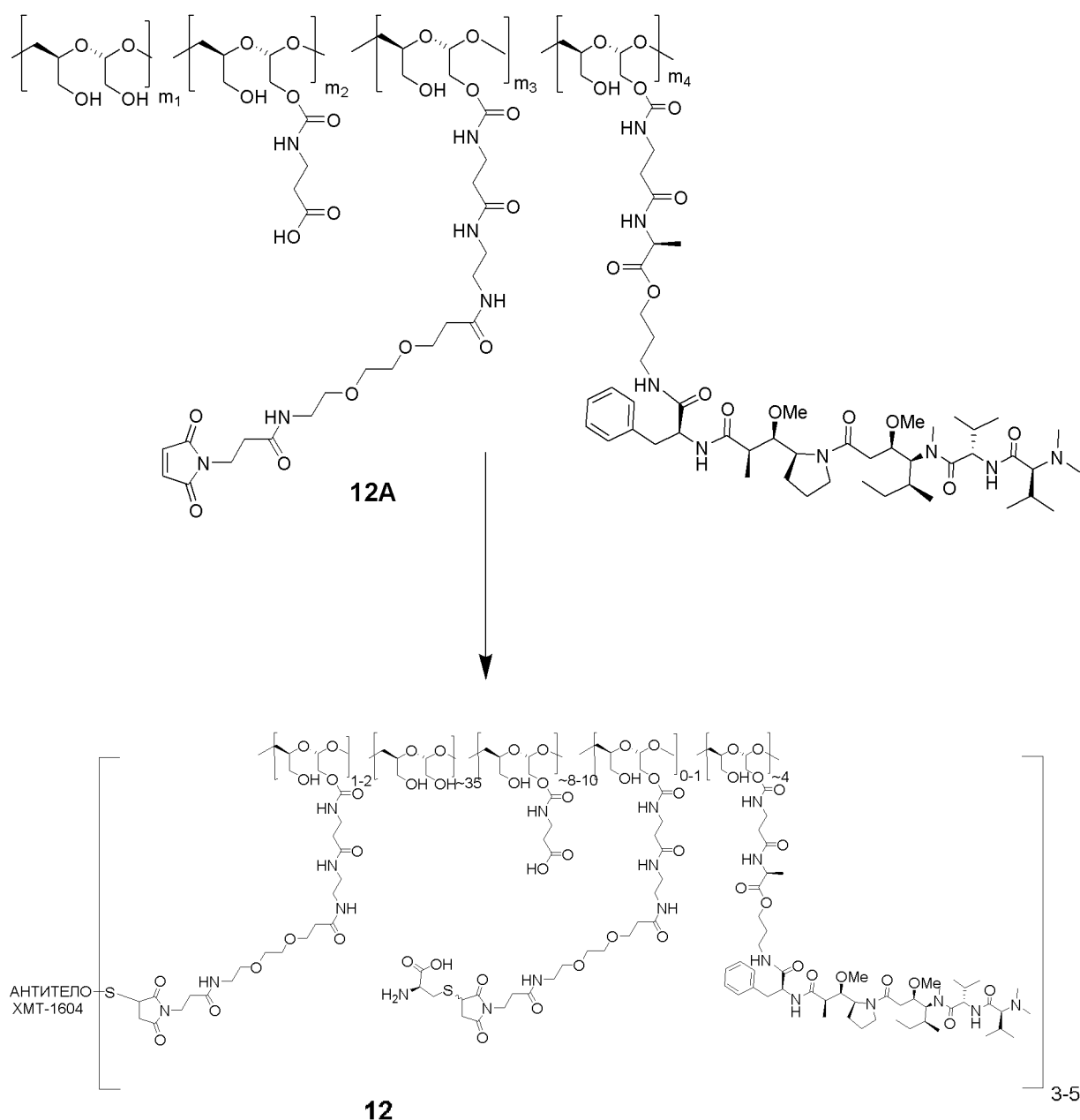
**Пример 11: Синтез конъюгата 11 B7-H4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 5,9**



где  $\blacksquare$  представляет собой GlcNAc;  $\triangle$  представляет собой Fuc; и  $\square$  представляет собой GalNAc.

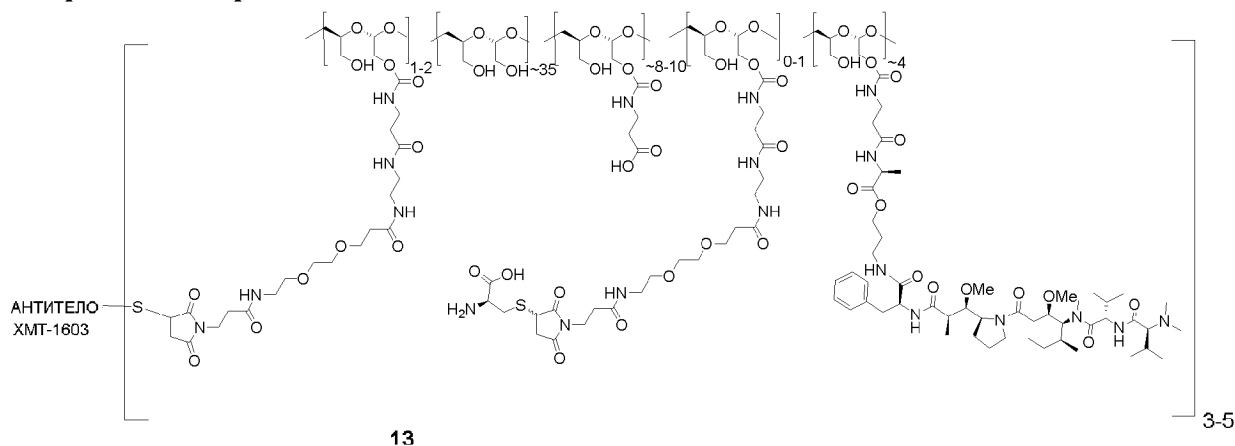
**[859]** Конъюгат **11** синтезировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что на стадии 2 использовали азидо-модифицированного антитела B7-H4\_2F9 (21,2 мг, 0,147 мкмоль, полученное, как описано в Примере 1, стадия 1) вместо азидо-модифицированного антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **11** (11,2 мг, выход 53%) имел DAR 5,9 при определении посредством ОФ-ВЭЖХ с восстановлением.

**Пример 12: Синтез конъюгата 12 XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18)-цитотоксическое лекарственное средство 12, DAR 11,9**

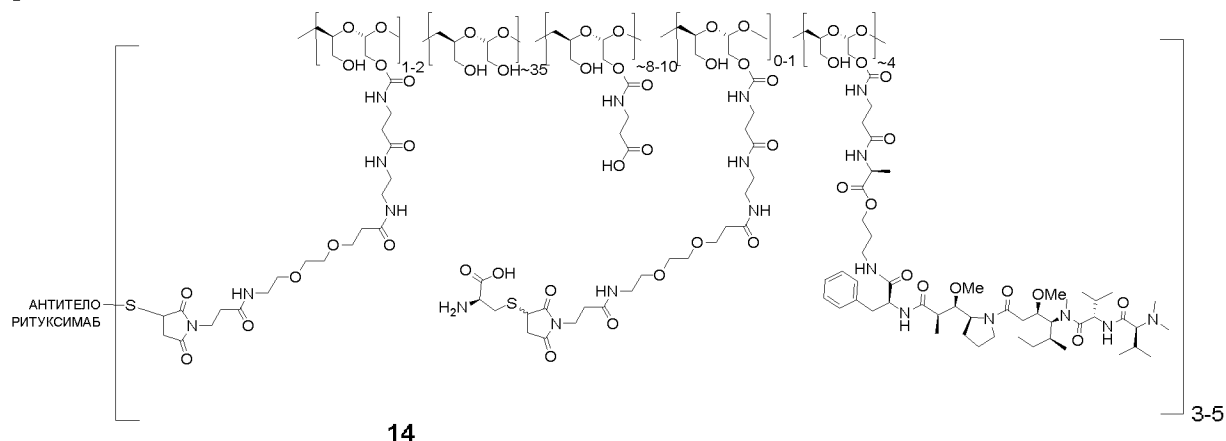


**[860]** К раствору антитела XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (20 мг, 0,139 мкмоль) в буфере ТЕАА, рН 7, (4 мл) добавляли раствор ТСЕР (0,0993 мг, 0,347 мкмоль) при перемешивании. Смесь инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Затем частично восстановленное антитело XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) добавляли к энергично перемешиваемому раствору каркаса **12A** (18 мг, 1,807 мкмоль, полученный, как описано в US 9849191) в буфере ТЕАА, рН 6 (1,8 мл). Перемешивание продолжали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию гасили водным раствором цистеина (0,421 мг, 3,47 мкмоль) в буфере ТЕАА, рН 7 (0,084 мл). После перемешивания в течение 30 минут при температуре окружающей среды при рН 7,0 реакционную смесь подкисляли до рН 5,8. Неочищенный продукт очищали посредством WCX с получением конъюгата **12** (10 мг, выход 50%), который имел а DAR 11,9 при определении посредством гидролиза с последующей ОФ-ВЭЖХ.

**Пример 13: Синтез конъюгата XMT-1603 (B7-H4\_2F9V7)-цитотоксическое**

**лекарственное средство 13, DAR 11,8**

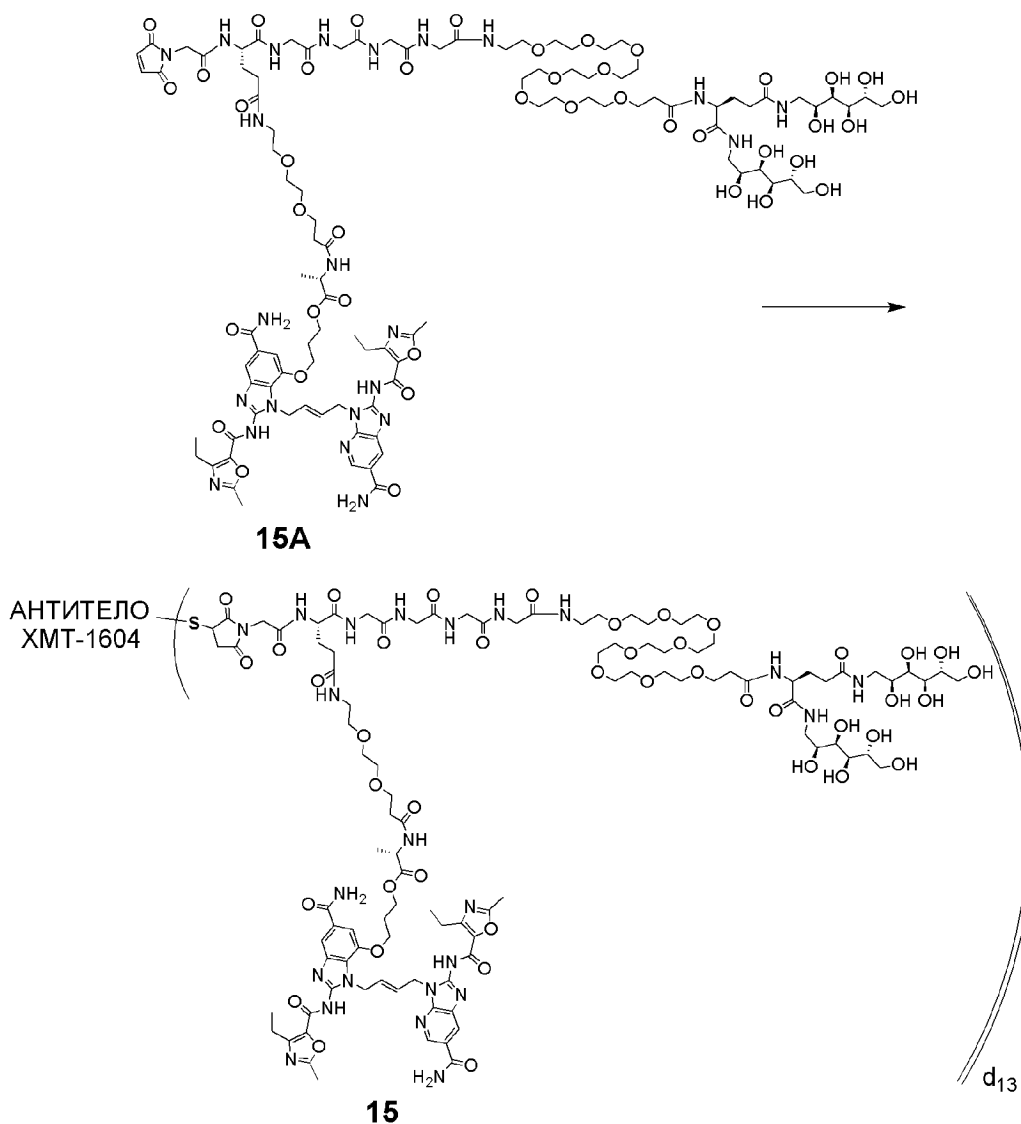
**[861]** Конъюгат **13** синтезировали, как описано в Примере 12, за исключением того, что использовали антитело ХМТ-1603 (B7-H4\_2F9V7) (20 мг, 6,99 мкмоль) вместо антитела ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **13** (11,5 мг, выход 58%) имел DAR 11,8 при определении посредством гидролиза с последующей ОФ-ВЭЖХ.

**Пример 14: Синтез конъюгата 15 ритуксимаб-цитотоксическое лекарственное средство, DAR 10,8**

**[862]** Конъюгат **14** синтезировали, как описано в Примере 12, за исключением того, что использовали антитело ритуксимаб (100 мг, 6,99 мкмоль) вместо антитела ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18). Очищенный конъюгат **14** (62,6 мг, выход 63%) имел DAR 10,8 при определении посредством гидролиза с последующей ОФ-ВЭЖХ.

**Пример 15: Синтез конъюгата 15 ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18)-лекарственное средство-агонист STING, DAR 6,8**



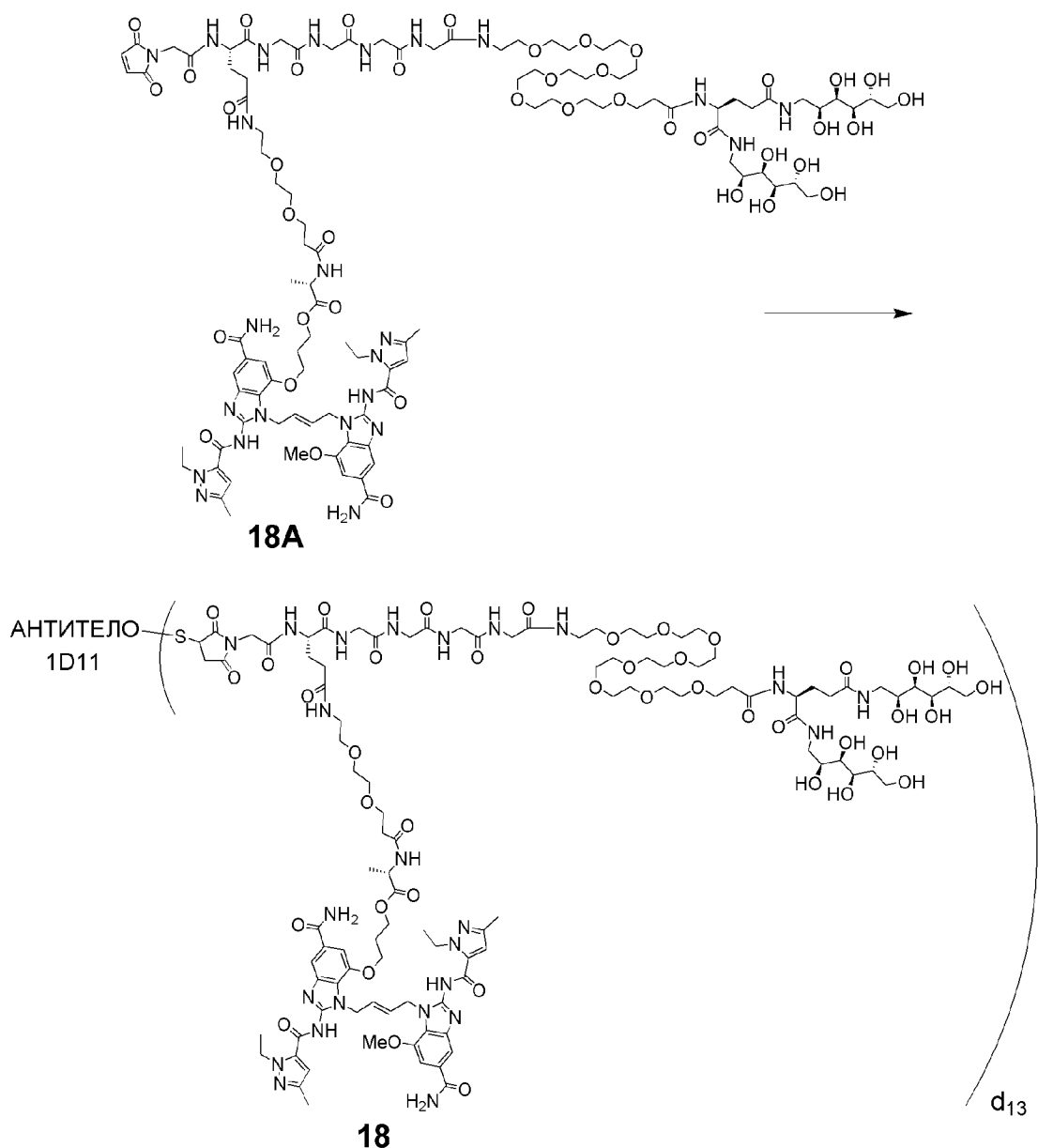


**[863]** К раствору XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (8 мг, 0,055 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфер EDTA, pH 7,0, (1,53 мл) добавляли раствор TCEP (8 мг, 0,055 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7,0, (0,075 мл) при перемешивании. Смесь инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C. Затем добавляли восстановленный XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) к раствору каркаса **15A** (полученного, как описано в US 17/221341, 1,18 мг, 0,5 мкмоль) в DMA (0,16 мл) при перемешивании. Перемешивание проводили в течение 1 ч при 37°C. Реакцию гасили водным раствором цистеина (0,1 мг, 0,83 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7, (0,02 мл). После перемешивания в течение 45 минут при температуре окружающей среды при pH 7 неочищенный продукт очищали посредством хроматографии СНТ с получением конъюгата **15** (7,6 мг, выход 95%), который имел DAR 6,8 при определении посредством спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра. Конъюгаты **15-1** и **15-2** синтезировали сходным образом, и детали для соответствующих очищенных конъюгатов приведены в таблице ниже.

| Конъюгат | DAR | XMT-1604(B7-H4_2F9V18) | TCEP               | Каркас 15A          |
|----------|-----|------------------------|--------------------|---------------------|
| 15       | 6,8 | 8 мг, 0,055 мкмоль     | 8 мг, 0,055 мкмоль | 1,18 мг, 0,5 мкмоль |

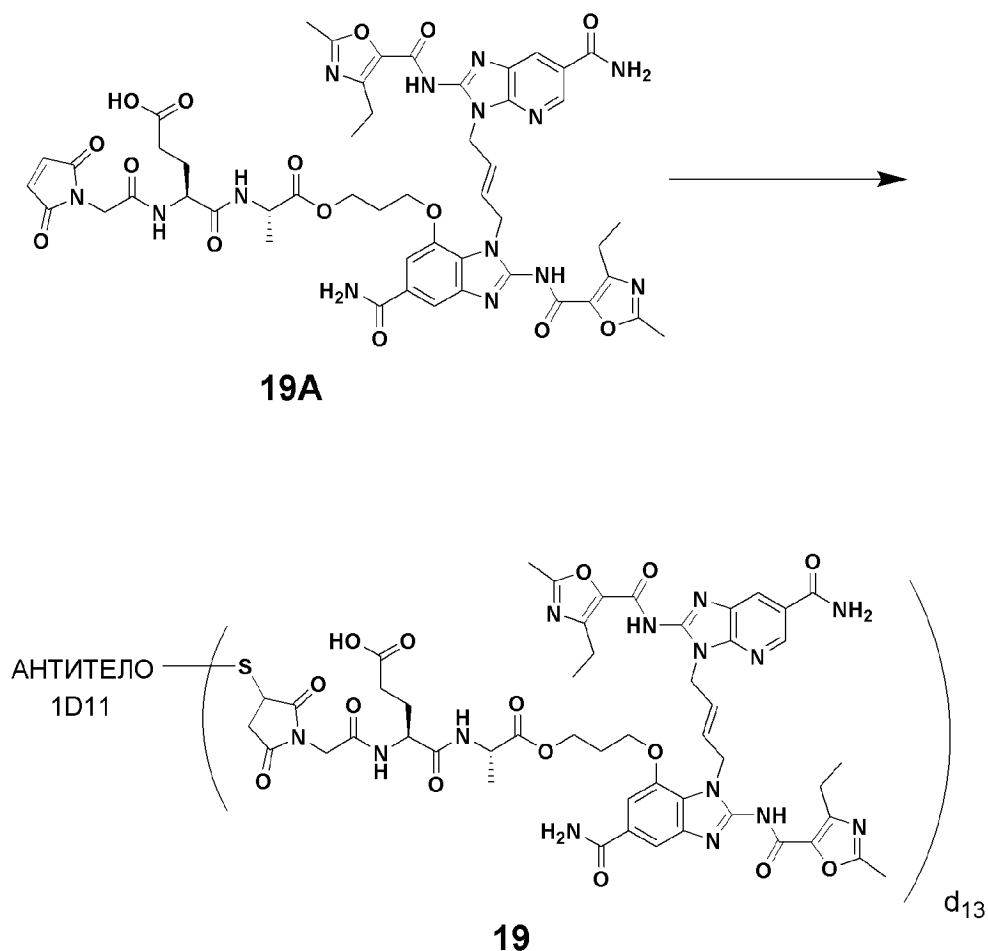


конъюгат **17** (7 мг, выход 87,5%) имел DAR 6,8 при определении посредством спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра.



**Пример 18: Синтез конъюгата 18 1D11-агонист STING, DAR 6,9**

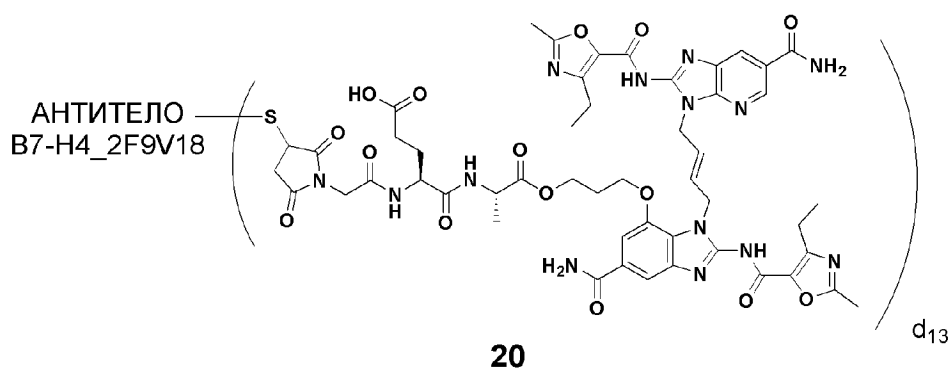
**[866]** К раствору 1D11 (15,9 мг, 0,109 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7,0 (3,105 мл) добавляли раствор TCEP (0,125 мг, 0,436 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7,0 (0,075 мл) при перемешивании. Смесь инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C. Затем восстановленное 1D11 добавляли к раствору каркаса 18A (полученный, как описано в US 17/221341, 2,084 мг, 0,872 мкмоль) в DMA (0,31 мл) при перемешивании. Перемешивание продолжали в течение 1 ч при 37°C. Реакцию гасили водным раствором цистеина (0,198 мг, 1,635 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7 (0,04 мл). После перемешивания в течение 45 минут при температуре окружающей среды при pH 7 неочищенный продукт очищали посредством хроматографии СХТ с получением конъюгата **18** (10,8 мг, выход 68%), который имел DAR 6,9 при определении посредством спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра.



**Пример 19: Синтез конъюгата 19 1D11-агонист STING, DAR 6,5**

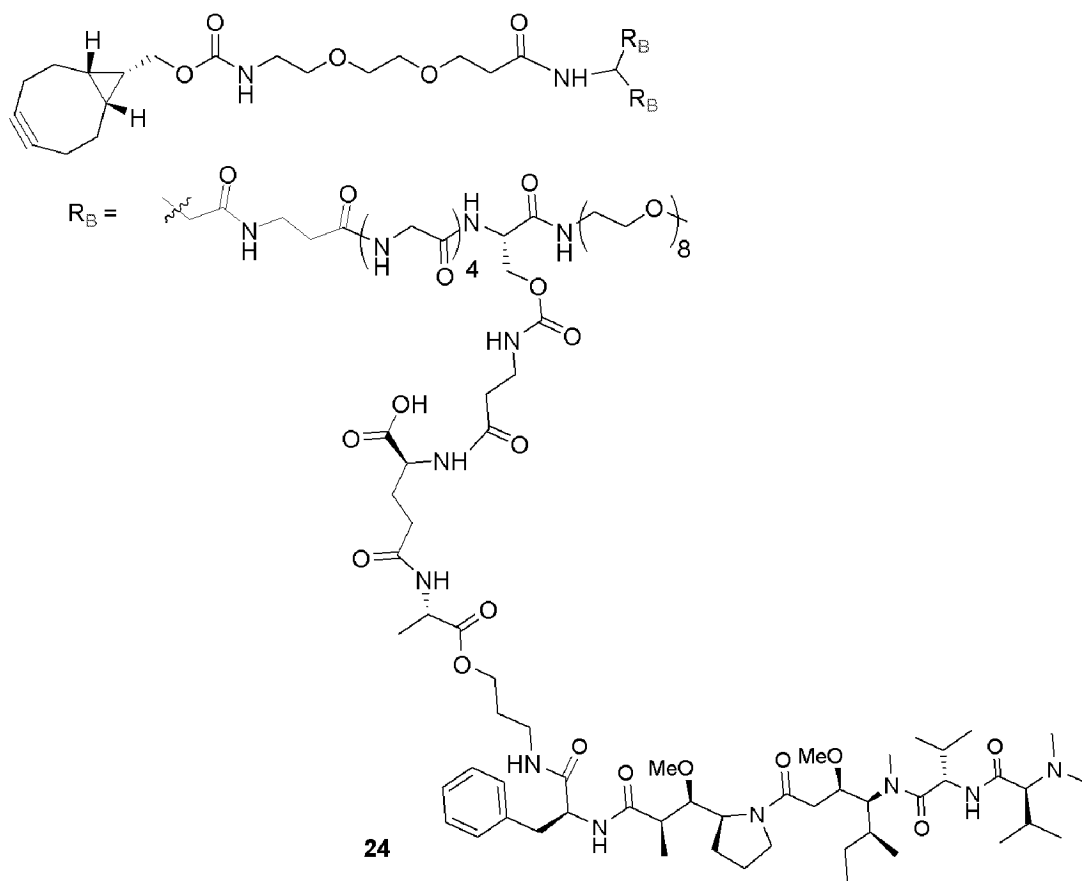
**[867]** К раствору 1D11 (10 мг, 0,069 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7,0 (1,921 мл) добавляли раствор TCER (0,079 мг, 0,276 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7,0 (0,079 мл) при перемешивании. Смесь инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C. Затем восстановленный 1D11 добавляли к раствору каркаса 20A (полученный, как описано в US 17/221,341, 0,606 мг, 0,552 мкмоль) в DMA (0,2 мл) при перемешивании. Перемешивание продолжали в течение 1 ч при 37°C. Реакцию гасили водным раствором цистеина (0,125 мг, 1,035 мкмоль) в 50 мМ HEPES, 1 мМ буфере EDTA, pH 7 (0,013 мл). После перемешивания в течение 45 минут при температуре окружающей среды при pH 7 неочищенный продукт очищали посредством хроматографии СХТ с получением конъюгата **19** (8,2 мг, выход 82%), который имел DAR 6,5 при определении посредством спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра.

**Пример 20: Синтез конъюгата 21 B7-H4\_2F9V18-агонист STING, DAR 6,9**

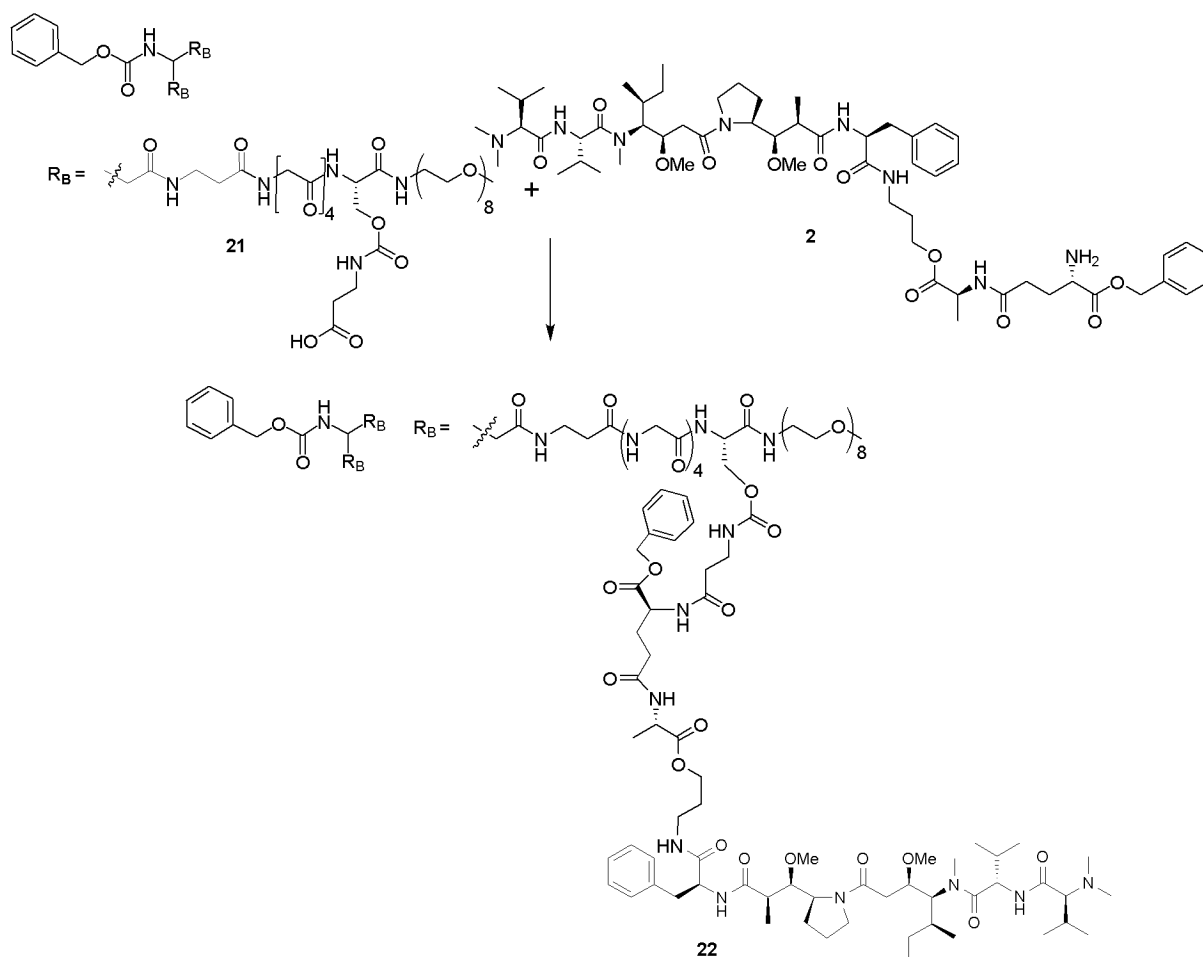


**[868]** Конъюгат **20** синтезировали, как описано в примере 19, за исключением того, что использовали антитело XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) (10 мг, 0,069 мкмоль) вместо антитела 1D11. Очищенный конъюгат **20** (6,2 мг, выход 62%) имел DAR 6,9 при определении посредством спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра.

#### Пример 21: Синтез каркаса **24**

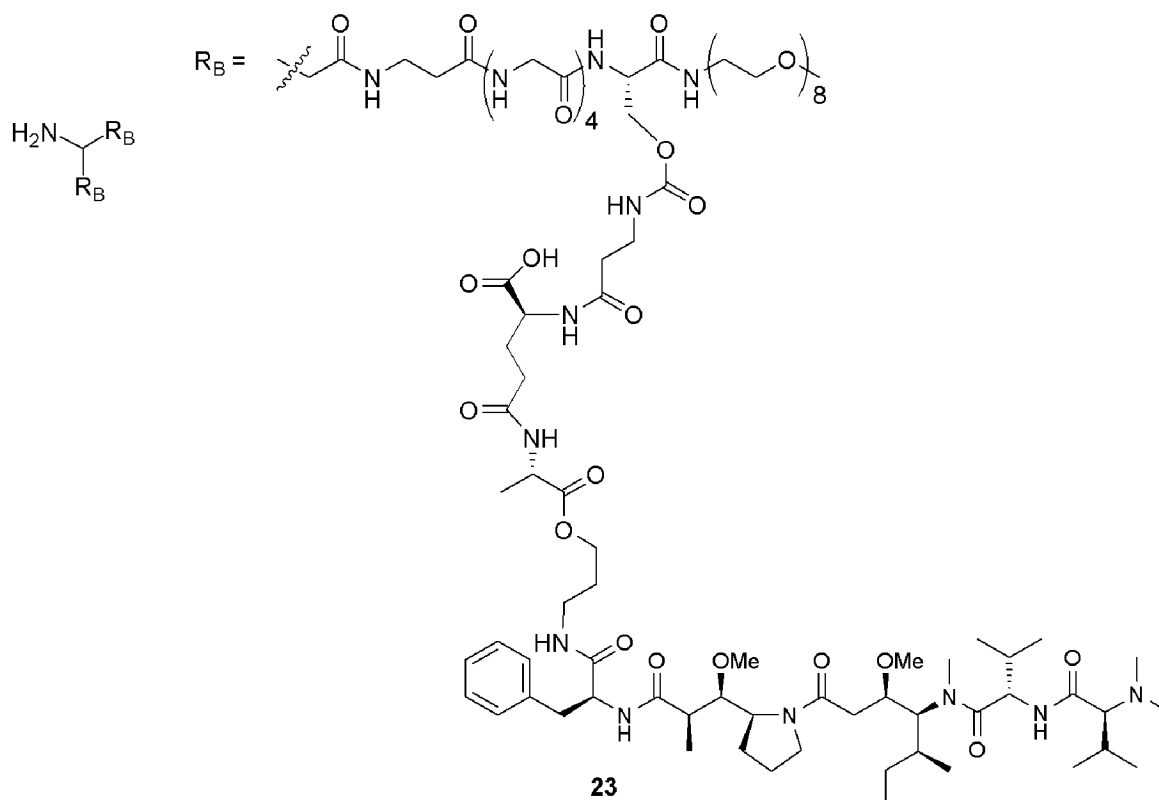


Стадия 1. Соединение **22**



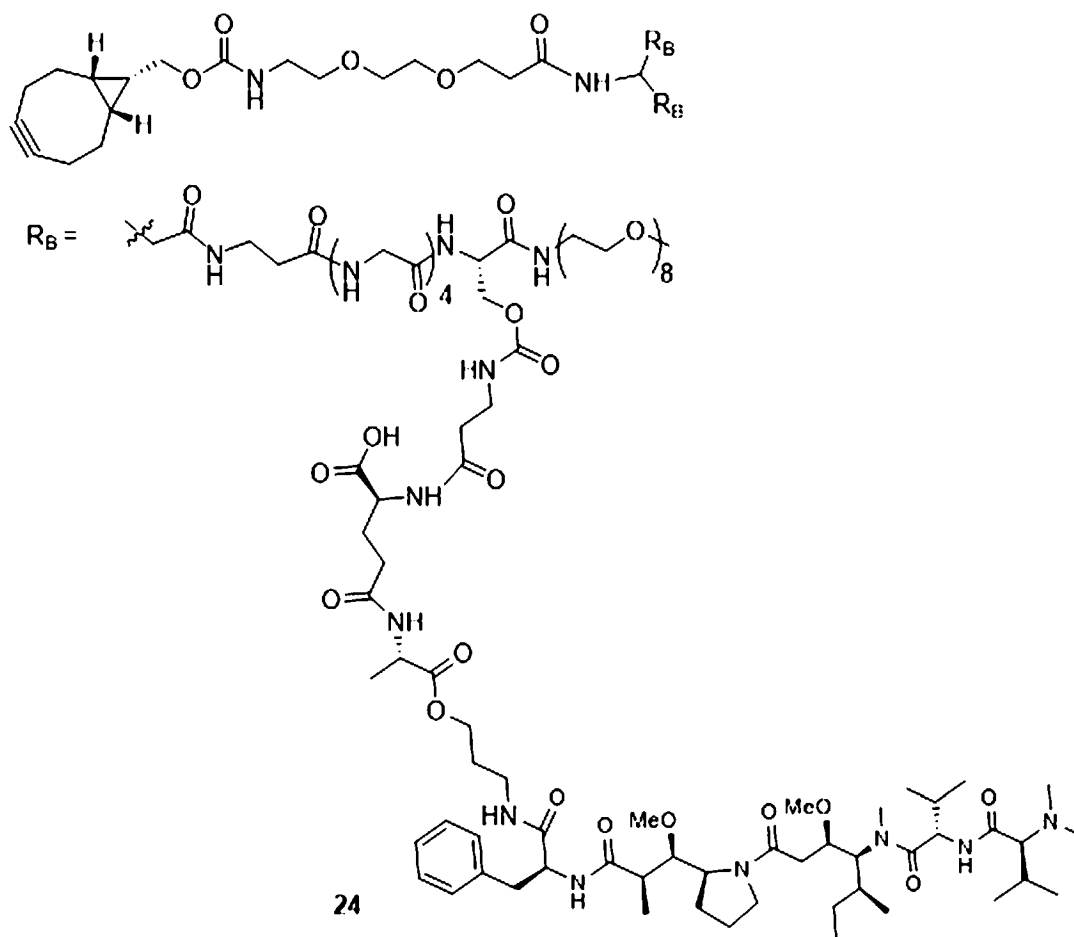
**[869]** Соединение **21** (250 мг, 0,124 ммоль, полученное с использованием методик, описанных в US 15/819,650, полное содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки), воду (5,9 мл), NMP (1,5 мл), EDC (166 мг, 0,868 ммоль) и HOAt (0,041 мг, 0,298 ммоль) перемешивали на ледяной бане и pH довели до ~6,5 посредством 1 Н NaHCO<sub>3</sub> (водн). Добавляли соединение **2** (631 мг, 0,558 ммоль), а затем pH довели до ~6,5. Полученную смесь перемешивали холодной в течение 3 ч. Добавляли дополнительный EDC, HOAt и соединение **2** (198 мг, 0,164 ммоль) и перемешивание продолжали в течение ночи. Реакционную смесь очищали на кассете C18 (100 г) со ступенчатым градиентом ACN/H<sub>2</sub>O от 10% до 60% до 100% об./об. ACN/H<sub>2</sub>O. Желаемые фракции лиофилизировали с получением соединения **22** в виде белого аморфного твердого вещества (275 мг, выход 53%). MS: 2083,64 (2<sup>+</sup>), 1389,43 (3<sup>+</sup>), 1042,35 (4<sup>+</sup>).

*Стадия 2. Соединение 23*



**[870]** Соединение 22 (375 мг, 0,09 ммоль), EtOH (1,5 мл) и воду (1,5 мл) смешивали в стеклянной бутылке Парра. Через смесь барботировали аргон, а затем добавляли Pd/C (9,5 мг, 0,009 ммоль). Бутылку подсоединяли к оборудованию для гидрогенизации, а затем последовательно подключали вакуумный насос, заполняли аргон, а затем заполняли водородом (0,762 мг, 0,378 ммоль) до 30 фунт/кв. дюйм (2,1 бар), и смесь энергично перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через слой силикагеля и концентрировали до масла. Масло растворяли в ACN/H<sub>2</sub>O и лиофилизировали с получением соединения **23** в качестве белого аморфного твердого вещества (220 мг, выход 63%). MS: 1926,60 (2<sup>+</sup>), 1284,74(3<sup>+</sup>), 963,80 (4<sup>+</sup>).

*Стадия 3. Каркас 24*

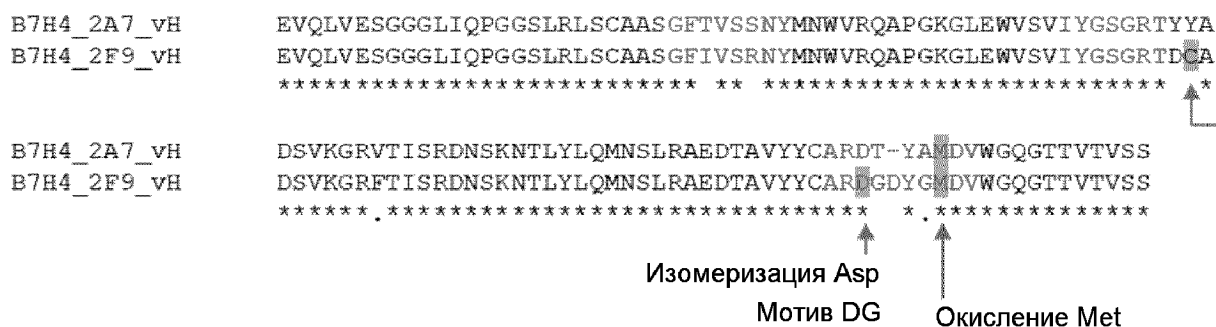


[871] К ледяному раствору соединения **23** (150 мг, 0,039 ммоль) в ACN (1,04 мл) и DMF (0,500 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)-3-оксо-2,7,10-триокса-4-азатридекан-13-оат (35 мг, 0,078 ммоль) и DIPEA (0,027 мл, 0,156 ммоль), конечное значение pH ~8-9. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, затем концентрировали и очищали на препаративной ВЭЖХ с использованием ACN/H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) в качестве подвижной фазы. Желаемые фракции лиофилизировали с получением каркаса **24** в качестве белого аморфного твердого вещества (93,1 мг, выход 57%). MS: 2094,23 (2<sup>+</sup>), 1396,43 (3<sup>+</sup>), 1047,62 (4<sup>+</sup>) 838,30 (5<sup>+</sup>).

**Пример 22: Идентификация рисков посттрансляционных модификаций для B7-H4\_2F9 и получение вариантов B7-H4.**

[872] Анализ областей VH и VL B7-H4\_2F9 и B7-H4\_2A7 (описаны в US20110085970A1) идентифицировал потенциальные недостатки посттрансляционной модификации (PTM), предположительно являющиеся нежелательными вследствие потенциальных рисков, связанных с возможностью разработки антитела. Как показано ниже, результат этого анализа идентифицировал потенциальные риски в VH-цепи B4-H4\_2F9. Они включали, в порядке снижения теоретического риска: неканонический остаток цистеина, потенциальный участок изомеризации Asp и потенциальный участок окисления Met для B7-H4\_2F9, показанные ниже.





**[873]** Получали варианты антитела B4-H4\_2F9 для устранения потенциальных рисков PTM при сохранении желаемых свойств антител, как обобщенно представлено в таблице 1. Каждый полученный вариант антитела содержал одно из четырех изменений для устранения риска неканонического цистеина (DC на YY, DY, DA или DS). Варианты содержали эти мутации отдельно (B7-H4\_2F9V1, B7-H4\_2F9V6, B7-H4\_2F9V11, B7-H4\_2F9V16) или в комбинации с другими мутациями, включая четыре варианта, которые также имели мутации, которые устраняли потенциальный участок изомеризации Asp (DG на DA), в дополнение к устранению риска неканонического цистеина: B7-H4\_2F9V2, B7-H4\_2F9V7, B7-H4\_2F9V12, B7-H4\_2F9V17. Четыре варианта имели эти мутации плюс дополнительную мутацию для устранения потенциального риска окисления метионина (MDV на LDV; B7-H4\_2F9V3, B7-H4\_2F9V8, B7-H4\_2F9V13, B7-H4\_2F9V18), таким образом, устраняя все три потенциальных недостатка PTM. Было сконструировано четыре варианта для устранения последовательности изомеризации Asp путем встраивания области HCDR3 2A7 вместо области B4-H4\_2F9 HCDR3 (B7-H4\_2F9V4, B7-H4\_2F9V9, B7-H4\_2F9V14, B7-H4\_2F9V19), в дополнение к наличию мутаций для устранения риска неканонического цистеина. Остальные четыре варианта содержали мутации для устранения риска неканонического цистеина, риска изомеризации Asp путем включения области HCDR3 2A7, и мутацию MDV на LDV для устранения риска окисления метионина (B7-H4\_2F9V5, B7-H4\_2F9V10, B7-H4\_2F9V15, B7-H4\_2F9V20). В таблице 1 обобщенно представлены варианты последовательности антитела B4-H4\_2F9 и устраненные недостатки PTM.

Таблица 1

|                                    |             | Мутации для устранения неканонического цистеина |                             |              |              |
|------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| Устраняемые<br>риски PTM           | Мутации     | DC на YY                                        | DC на DY                    | DC на DA     | DC на DS     |
| Нет<br>дополнительных<br>изменений |             | B7-H4_2F9V1                                     | B7-H4_2F9V6                 | B7-H4_2F9V11 | B7-H4_2F9V16 |
| Изомеризация<br>Asp                | DG на<br>DA | B7-H4_2F9V2                                     | XMT-1603(+K)<br>B7-H4_2F9V7 | B7-H4_2F9V12 | B7-H4_2F9V17 |

|                                      |                               | Мутации для устранения неканонического цистеина |              |              |                              |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|--------------|--------------|------------------------------|
| Устранимые<br>риски PTM              | Мутации                       | DC на YY                                        | DC на DY     | DC на DA     | DC на DS                     |
| Изомеризация<br>Asp+окисление<br>Met | DG на<br>DA<br>MDV на<br>LDV  | B7-H4_2F9V3                                     | B7-H4_2F9V8  | B7-H4_2F9V13 | XMT-1604(+K)<br>B7-H4_2F9V18 |
| Изомеризация<br>Asp                  | 2A7<br>HCDR3                  | B7-H4_2F9V4                                     | B7-H4_2F9V9  | B7-H4_2F9V14 | B7-H4_2F9V19                 |
| Изомеризация<br>Asp+окисление<br>Met | 2A7<br>HCDR3<br>MDV на<br>LDV | B7-H4_2F9V5                                     | B7-H4_2F9V10 | B7-H4_2F9V15 | B7-H4_2F9V20                 |

**Пример 23: Связывание родительского антитела B7-H4\_F9 и 20 вариантов антитела B7-H4\_2F9 с белком B7-H4 человека посредством ELISA**

[874] Рекомбинантным белком B7-H4 человека (R&D Systems #6576-B7-050) покрывали поверхность каждой лунки 96 луночного планшета посредством инкубации с пептидом (1 мкг/мл в PBS) в течение ночи при 4°C. Затем лунки блокировали посредством инкубации с BSA (5% в PBS, содержащий 0,1% Tween 20 (PBST)) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли диапазон разведений (от 0,0061 нМ до 100 нМ; 4-кратные серийные разведения в 3% BSA в PBS) тестируемых образцов (B7-H4\_2F9 и 20 вариантов антитела B7-H4\_2F9) и планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном качании. Несвязанный тестируемый образец удаляли путем промывания PBST (3x). Вторичный противочеловеческий IgG, конъюгированный с HRP (0,16 мкг/мл в PBST), инкубировали в каждой лунке в течение 1 часа. Несвязанное вторичное антитело удаляли путем промывания PBST (3x). В каждую лунку добавляли субстрат HRP, TMB, и инкубировали до тех пор, пока синий цвет не становился видимым. Реакцию гасили добавлением серной кислоты (0,2 Н, 100 мкл). Поглощение при 450 нм измеряли в устройстве для считывания планшетов (Molecular Devices, Spectramax M5). Величины наносили на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Величины EC<sub>50</sub> определяли посредством четырехпараметрической аппроксимации кривой. В таблице 2 обобщенно представлены величины связывания (EC<sub>50</sub>).

**Таблица 2**

| Антитело  | Связывание с белком B7-H4 человека,<br>EC <sub>50</sub> , нМ |
|-----------|--------------------------------------------------------------|
| B7-H4_2F9 | 1,46                                                         |

| Антитело                     | Связывание с белком В7-Н4 человека,<br>EC <sub>50</sub> , нМ |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| B7-H4_2F9V1                  | 11,67                                                        |
| B7-H4_2F9V2                  | 4,23                                                         |
| B7-H4_2F9V3                  | 2,81                                                         |
| B7-H4_2F9V4                  | 11,41                                                        |
| B7-H4_2F9V5                  | 2,04                                                         |
| B7-H4_2F9V6                  | 5,43                                                         |
| XMT-1603(+K)<br>B7-H4_2F9V7  | 4,33                                                         |
| B7-H4_2F9V8                  | 2,74                                                         |
| B7-H4_2F9V9                  | 3,00                                                         |
| B7-H4_2F9V10                 | 2,13                                                         |
| B7-H4_2F9V11                 | 6,74                                                         |
| B7-H4_2F9V12                 | >100                                                         |
| B7-H4_2F9V13                 | 3,71                                                         |
| B7-H4_2F9V14                 | 4,40                                                         |
| B7-H4_2F9V15                 | 1,24                                                         |
| B7-H4_2F9V16                 | 4,23                                                         |
| B7-H4_2F9V17                 | 3,35                                                         |
| XMT-1604(+K)<br>B7-H4_2F9V18 | 3,97                                                         |
| B7-H4_2F9V19                 | 0,94                                                         |
| B7-H4_2F9V20                 | 0,95                                                         |

[875] Как показано в таблице 2, родительское антитело B7-H4\_2F9 связывается с белком В7-Н4 человека с величиной EC<sub>50</sub> 1,46 нМ, и эти варианты В4-Н4\_2F9 связываются с белком В7-Н4 человека с величинами EC<sub>50</sub> от 0,94 нМ до >100 нМ. Большинство вариантов связываются со сходными величинами EC<sub>50</sub> (в пределах трехкратных значений) с В4-Н4\_2F9, за исключением B7-H4\_2F9V1, B7-H4\_2F9V4, B7-H4\_2F9V6, B7-H4\_2F9V11 и B7-H4\_2F9V14, которые связываются с В7-Н4 с величинами EC<sub>50</sub> между 4,40 и 11,67 нМ, и B7-H4\_2F9V12, которое не имело поддающегося измерению связывания в этом анализе.

**Пример 24: Связывание с клетками вариантов антитела 20 В7-Н4\_2F9 посредством FACS**

[876] Связывание вариантов антитела В7-Н4\_2F9 и рабочего антитела против В7-Н4 1D11 с клеточной поверхностью культивируемых клеток MX-1 и HCC1569 оценивали с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,

Германия). Клетки MX-1 выращивали в DMEM:F12K (Life Technologies) с 10% FBS (Life Technologies) и 1% пенициллином/стрептомицином (Life Technologies). Клетки HCC1569 выращивали в RPMI (ATCC) с 10% FBS (Life Technologies) и 1% пенициллином/стрептомицином (Life Technologies). Для окрашивания клетки открепляли посредством обработки раствором для открепления клеток Accutase (Innovative Cell Technologies). Открепленные клетки растирали в среде и помещали в 96-луночные U-образные планшеты с плотностью 50000 клеток в среде (75 мкл). Клетки инкубировали на льду в течение 3 часов с диапазоном концентраций (от 100 нМ до 0,0128 нМ; 3-кратные серийные разведения) тестируемых образцов в общем объеме среды 100 мкл с 6% сывороткой козы. Клетки промывали ледяным PBS (3x), осаждали при  $1000 \times \text{RCF}$  между стадиями промывания и ресуспендировали в RPMI-1640 с 2% сывороткой козы (100 мкл) и вторичным флуоресцентно меченным антителом, Alexa Fluor<sup>®</sup> 647-меченное антитело козы против IgG человека (5 мкг/мл, Life Technologies) в течение 1 часа на льду. Клетки промывали ледяным PBS (3x) и ресуспендировали в ледяном PBS с 1% параформальдегидом (100 мкл). Флуоресценцию на клетку определяли посредством анализа 5000 клеток для каждой обработки на проточном цитометре. Срединную величину флуоресценции для каждой обработки наносили на график и величины  $\text{EC}_{50}$  вычисляли с использованием программного обеспечения Graphpad Prism посредством четырехпараметрической аппроксимации кривой.

[877] В таблице 3 обобщенно представлены величины  $\text{EC}_{50}$  для вариантов антитела 20 B7-H4\_2F9 в отношении связывания с указанными клеточными линиями.

**Таблица 3**

| <b>Антитело</b>             | <b>Связывание с клетками<br/>MX-1, <math>\text{EC}_{50}</math>, нМ</b> | <b>Связывание с клетками<br/>HCC1569, <math>\text{EC}_{50}</math>, нМ</b> |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1D11                        | 4,9                                                                    | 3,44                                                                      |
| B7-H4_2F9                   | 1,58                                                                   | 1,26                                                                      |
| B7-H4_2F9V1                 | 1,95                                                                   | 1,6                                                                       |
| B7-H4_2F9V2                 | 4,43                                                                   | 2,28                                                                      |
| B7-H4_2F9V3                 | 1,16                                                                   | 0,71                                                                      |
| B7-H4_2F9V5                 | 0,92                                                                   | 0,69                                                                      |
| B7-H4_2F9V6                 | 1,6                                                                    | 1,15                                                                      |
| XMT-1603(+K)<br>B7-H4_2F9V7 | 1,94                                                                   | 1,59                                                                      |
| B7-H4_2F9V8                 | 1,86                                                                   | 1,45                                                                      |
| B7-H4_2F9V9                 | 1,06                                                                   | 1,05                                                                      |
| B7-H4_2F9V10                | 0,89                                                                   | 0,84                                                                      |
| B7-H4_2F9V11                | 1,28                                                                   | 1,25                                                                      |

| Антитело                     | Связывание с клетками<br>MX-1, EC <sub>50</sub> , нМ | Связывание с клетками<br>HCC1569, EC <sub>50</sub> , нМ |
|------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| B7-H4_2F9V13                 | 1,75                                                 | 1,1                                                     |
| B7-H4_2F9V15                 | 0,92                                                 | 0,52                                                    |
| B7-H4_2F9V16                 | 1,7                                                  | 1,21                                                    |
| B7-H4_2F9V17                 | 1,97                                                 | 1,47                                                    |
| XMT-1604(+K)<br>B7-H4_2F9V18 | 1,28                                                 | 1,12                                                    |
| B7-H4_2F9V19                 | 1,3                                                  | 0,66                                                    |
| B7-H4_2F9V20                 | 1,34                                                 | 0,88                                                    |

**[878]** Как показано в таблице 3, величины EC<sub>50</sub> для связывания с поверхностью клеток MX-1 находились в диапазоне от 0,9 до 4,43 нМ против 1,58 нМ для B4-H4\_2F9. Величины EC<sub>50</sub> для связывания большинства вариантов B7-H4\_2F9 с клетками MX-1 были в высокой степени сходными (в пределах двухкратной величины) с B4-H4\_2F9, за исключением B7-H4\_2F9V2, который имел величину 4,43 нМ. Величина EC<sub>50</sub> для связывания антитела 1D11 с клетками MX-1 составляла 4,9 нМ. Величины EC<sub>50</sub> для связывания вариантов B4-H4\_2F9 с поверхностью клеток HCC1569 находились в диапазоне от 0,52 до 2,28 нМ, против 1,26 нМ для B4-H4\_2F9. Величины EC<sub>50</sub> для связывания большинства вариантов с клетками HCC1569 были в высокой степени сходными с B4-H4\_2F9, за исключением B7-H4\_2F9V15, который имел величину 0,52 нМ. Величина EC<sub>50</sub> для связывания антитела 1D11 с поверхностью клеток HCC1569 составляла 3,44 нМ.

**Пример 25: Оценка полиреактивности 20 вариантов антител B7-H4\_2F9 посредством ELISA**

**[879]** Полиреактивность 20 вариантов антител B7-H4\_2F9 и контролей оценивали посредством ELISA с бакуловирусными частицами (BVP). Планшеты покрывали 1% экстрактом BVP в карбонатном буфере, pH 9,6, при 4°C в течение ночи. Тестируемые антитела в концентрации 150, 50, 16,7 и 5,6 мкг/мл тестировали в трех экземплярах. Анализ проводили в соответствии со стандартным протоколом ELISA с использованием положительного контрольного антитела (IgG1-антитело человека для контроля полиспецифичности; MEDNA, каталожный номер # H1308) и отрицательного контрольного антитела (изотипический контрольный IgG1 человека MEDNA, каталожный номер # 1301; изотипический контрольный IgG мыши (Invitrogen, каталожный номер # 31903). Показатель BVP вычисляли на основе сигнала ELISA относительно фонового сигнала (только вторичное антитело) тестируемого антитела в концентрации 150 мкг/мл в трех экземплярах. В таблице 4 обобщенно представлен средний показатель BVP для антител.

**Таблица 4**

| Тестируемые образцы       | Показатель BVP |
|---------------------------|----------------|
| Положительный контроль    | 15,0           |
| Отрицательный контроль    | 2,2            |
| B7-H4_2F9                 | 10,7           |
| 1D11                      | 11,2           |
| B7-H4_2F9V1               | 14,5           |
| B7-H4_2F9V2               | 12,5           |
| B7-H4_2F9V3               | 26,7           |
| B7-H4_2F9V5               | 27,4           |
| B7-H4_2F9V6               | 6,8            |
| XMT-1603(+K)              | 4,0            |
| B7-H4_2F9V7               |                |
| B7-H4_2F9V8               | 3,4            |
| B7-H4_2F9V9               | 24,8           |
| B7-H4_2F9V10              | 21,3           |
| B7-H4_2F9V11              | 4,6            |
| B7-H4_2F9V13              | 12,4           |
| B7-H4_2F9V15              | 23,1           |
| B7-H4_2F9V16              | 6,3            |
| B7-H4_2F9V17              | 3,6            |
| XMT-1604(+K)              | 3,8            |
| B7-H4_2F9V18              |                |
| B7-H4_2F9V19              | 22,8           |
| B7-H4_2F9V20              | 18,8           |
| Только вторичное антитело | 1,0            |

**[880]** Как показано в таблице 4, показатель BVP B7-H4\_2F9 (10,7) является сходным с показателем антитела против 1D11. Результаты показали широкий диапазон показателей BVP в результате небольших изменений последовательности, внесенных в варианты относительно антитела B4-H4\_2F9. Все из вариантов B7-H4\_2F9V6, XMT-1603(+K) B7-H4\_2F9V7, B7-H4\_2F9V8, B7-H4\_2F9V11, B7-H4\_2F9V16, B7-H4\_2F9V17 и XMT-1604(+K) B7-H4\_2F9V18 имели показатели BVP, которые были более низкими, чем у антител B7-H4\_2F9 и 1D11, указывая на желаемое снижение полиреактивности. Остальные варианты имели показатели BVP, которые превышали показатели антитела B7-H4\_2F9,

антитела 1D11 и положительного контроля, включают антитела B7-H4\_2F9V3, B7-H4\_2F9V5, B7-H4\_2F9V9, B7-H4\_2F9V10, B7-H4\_2F9V15, B7-H4\_2F9V19 и B7-H4\_2F9V20. 5 вариантов (XMT-1603(+K) B7-H4\_2F9V7, B7-H4\_2F9V8, B7-H4\_2F9V11, B7-H4\_2F9V17 и XMT-1604(+K) B7-H4\_2F9V18) с наиболее низкими показателями BVP продемонстрировали желаемое снижение полиреактивности. Изменения последовательности и конечные показатели BVP нельзя было предсказать.

**Пример 26: Аффинность связывания вариантов антитела B7-H4\_2F9 с белком B7-H4 человека посредством Octet**

[881] Кинетику связывания B4-H4\_2F9, рабочего антитела 1D11 и 5 вариантов антитела против B7-H4 (XMT-1603(+K) (B7-H4\_2F9V7), B7-H4\_2F9V11, B7-H4\_2F9V16, B7-H4\_2F9V17 и XMT-1604(+K) (B7-H4\_2F9V18) определяли посредством биослойной интерферометрии (BLI; Octet; ForteBio), и величины аффинности определяли с использованием стандартных методик Octet (ForteBio). Антитела иммобилизовывали на биосенсорах с противочеловеческим Fc в 1х буфере для определения кинетики. Затем возрастающие концентрации рекомбинантного белка B7-H4 человека (R&D Systems #6576-B7-050) связывали с иммобилизованным пептидом в 1х буфере для определения кинетики. В таблице 5 обобщенно представлена  $K_d$  (равновесная константа диссоциации),  $k_{on}$  (константа скорости ассоциации) и  $k_{off}$  (константа скорости диссоциации) при 25°C для протестированных антител.

**Таблица 5**

| Тестируемые образцы           | $K_d$ (M) | $k_{on}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_{off}$ (s <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|-----------|---------------------------------------------|------------------------------|
| B7-H4_2F9                     | 1,39E-08  | 1,59E+05                                    | 2,21E-03                     |
| 1D11                          | 1,17E-10  | 1,25E+05                                    | 1,46E-05                     |
| XMT-1603(+K)<br>B7-H4_2F9V7   | 1,40E-08  | 1,15E+05                                    | 1,61E-03                     |
| B7-H4_2F9V11                  | 1,45E-08  | 1,84E+05                                    | 2,67E-03                     |
| B7-H4_2F9V16                  | 1,62E-08  | 1,38E+05                                    | 2,24E-03                     |
| B7-H4_2F9V17                  | 2,23E-08  | 7,39E+04                                    | 1,65E-03                     |
| XMT-1604 (+K)<br>B7-H4_2F9V18 | 1,10E-08  | 1,57E+05                                    | 1,72E-03                     |

[882] Как показано в таблице 5, антитело B7-H4\_2F9 и протестированные варианты антитела B7-H4\_2F9: XMT-1603(+K) (B7-H4\_2F9V7), B7-H4\_2F9V11, B7-H4\_2F9V16, B7-H4\_2F9V17 и XMT-1604(+K) (B7-H4\_2F9V18) имеют сравнимые величины аффинности для связывания с B7-H4 человека. Величины  $K_d$  для вариантов B4-H4\_2F9 находятся в диапазоне от 1,10E-08 до 2,23E-08 М по сравнению с 1,39E-08М для B4-H4\_2F9. Величины

$k_{on}$  для вариантов В4-Н4\_2F9 находятся в диапазоне от  $7,39E+04$  до  $1,84E+05$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) по сравнению с  $1,59E+05$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) для В4-Н4\_2F9. Величины  $k_{off}$  для вариантов В4-Н4\_2F9 находятся в диапазоне от  $1,61E-03$  до  $2,67E-03$   $s^{-1}$  по сравнению с  $2,21E-03$   $s^{-1}$  для В4-Н4\_2F9. Рабочее антитело 1D11 имеет величину  $K_d$ , которая более чем в 100 раз ниже, чем у В4-Н4\_2F9. Величина  $k_{on}$  антитела 1D11 является в высокой степени сходной (в пределах двукратной величины) с величинами В4-Н4\_2F9 и вариантов антител, но более чем в 100 раз ниже, чем у В7-Н4\_2F9 и вариантов.

**Пример 27: Оценка антитела ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) в отношении подавления Т-клеток**

[883] Клетки НЕК-293 дикого типа (НЕК-293-WT) или клетки НЕК293, модифицированные для экспрессии В7-Н4 (НЕК-293-В7-Н4), высевали и культивировали в минимальной поддерживающей среде Игла, дополненной 10% FBS и 5% пенициллином/стрептомицином, при плотности 50000 клеток в 96-луночном планшете, и им позволяли прикрепиться в течение ночи при  $37^{\circ}C$  в увлажненной атмосфере с 5%  $CO_2$ . На следующие сутки среду удаляли и заменяли средой для Т-клеток (модифицированная способ Искова среда Дульбекко с 10% FBS и 5% пенициллином/стрептомицином). Клетки инкубировали с рабочим антителом 1D11, антителом ХМТ-1604(+К) (В7-Н4\_2F9V18) или не связывающимся контрольным антителом паливизумабом в конечных концентрациях 50 нМ в течение 2 часов при  $37^{\circ}C$  перед добавлением  $CD3^{+}$  Т-клеток, полученных следующим образом. Замороженные РВМС человека ( $2,5 \times 10^7$  клеток) размораживали и обогащали  $CD3^{+}$  Т-клетками с использованием набора для выделения Т-клеток человека Easy step<sup>TM</sup> (StemCell Technologies).  $CD3^{+}$  Т-клетки метили с использованием набора для определения пролиферации клеток CellTrace<sup>TM</sup> Violet (CTV; ThermoFisher Scientific) и доводили до  $2 \times 10^6$  клеток/мл. CTV-меченные Т-клетки ( $1 \times 10^5$ ) добавляли к обработанным тестируемым образцам клеток НЕК-293-WT или НЕК-293-В7-Н4, стимулировали активатором  $CD3/CD28$  Т-клеток человека Immunocult<sup>TM</sup> (StemCell Technologies) и инкубировали при  $37^{\circ}C$  в 5%  $CO_2$ . После сокультивирования в течение 4 суток НЕК-293-WT или НЕК-293-В7-Н4 с CTV-мечеными Т-клетками пролиферацию Т-клеток оценивали путем разбавления CTV-меченных Т-клеток с использованием проточной цитометрии. Сокультивированные клетки (CTV-меченные Т-клетки и клетки НЕК-293-WT/НЕК-293-В7-Н4) из каждой группы переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном, промывали PBS, окрашивали красителем для окрашивания погибших клеток Live/dead Fixable Aqua (ThermoFisher Scientific), а затем дополнительно окрашивали конъюгированными с флуорофором специфическими к мишени или изотипическими контрольными антителами (FITC против  $CD45$  человека, PE/Cy7 против  $CD4$  человека, PE против  $CD8$  человека). Клетки фиксировали и поверхностную экспрессию представляющих интерес белков определяли посредством анализа с использованием проточной цитометрии на проточном цитометре MACSQuant. Анализ данных проводили посредством программного обеспечения FlowJo с использованием следующего иерархического потока: 1) единичный гейт, 2) живые клетки, 3)  $CD45^{+}$  клетки и 4) разбавленные CTV (по



сравнению с нестимулированными Т-клетками). Процент пролиферации CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток вычисляли с использованием CD4<sup>+</sup> в комбинации с разбавленным CTV и CD8<sup>+</sup> в комбинации с разбавленным CTV, соответственно. Данные соответствуют среднему значению ( $\pm$  стандартное отклонение) для трех экземпляров лунок для каждого тестируемого образца. В таблице 6 приведена популяция (%) живых клеток, CD45<sup>+</sup>, пролиферирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток и пролиферирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток для каждого условия.

Таблица 6

|                                               | Обработка       |                |                 |                |                |                |
|-----------------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| % Популяция                                   | НЕК-293-WT      |                |                 | НЕК-293-B7-H4  |                |                |
| [001]                                         | Паливизум аб    | 1D11           | 2F9 V18         | Паливизум аб   | 1D11           | 2F9 V18        |
| <sup>a</sup> Живые клетки                     | 78,2 $\pm$ 0,4  |                | 81,1 $\pm$ 0,8  | 80,1 $\pm$ 2,0 |                | 79,1 $\pm$ 1,4 |
| [001]                                         | 85,6 $\pm$ 11,2 | 82,7 $\pm$ 6,4 | 77,0 $\pm$ 10,6 | 95,5 $\pm$ 2,8 | 96,2 $\pm$ 3,3 | 96,3 $\pm$ 1,5 |
| <sup>b</sup> CD45 <sup>+</sup>                | 69,0 $\pm$ 5,1  |                | 70,5 $\pm$ 2,4  | 48,3 $\pm$ 4,1 |                | 58 $\pm$ 3,4   |
|                                               | 43,0 $\pm$ 11,0 | 43,2 $\pm$ 9,5 | 46,0 $\pm$ 5,2  | 50,1 $\pm$ 3,7 | 46,1 $\pm$ 5,5 | 43,6 $\pm$ 1,9 |
| <sup>c</sup> Пролиферирующие CD4 <sup>+</sup> | 32,9 $\pm$ 2,6  |                | 35,9 $\pm$ 3,1  | 14,0 $\pm$ 1,6 |                | 20,1 $\pm$ 6,0 |
|                                               | 22,4 $\pm$ 2,3  | 30,1 $\pm$ 2,9 | 34,9 $\pm$ 8,1  | 3,4 $\pm$ 2,1  | 2,1 $\pm$ 0,4  | 4,1 $\pm$ 1,8  |
| <sup>c</sup> Пролиферирующие CD8 <sup>+</sup> | 9,5 $\pm$ 1,6   |                | 11,0 $\pm$ 0,9  | 3,4 $\pm$ 0,5  |                | 5,5 $\pm$ 1,6  |
| [001]                                         | 3,5 $\pm$ 0,8   | 5,8 $\pm$ 1,2  | 5,1 $\pm$ 1,8   | 1,1 $\pm$ 0,6  | 0,4 $\pm$ 0,2  | 1,1 $\pm$ 0,5  |

<sup>a</sup> гейтированы по единичному гейту; <sup>b</sup> гейтированы по живым клеткам; <sup>c</sup> гейтированы по единичному гейту/живым клеткам/CD45<sup>+</sup>

**[884]** Как показано в таблице 6, доли пролиферирующих CD4<sup>+</sup> клеток и пролиферирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток снижались на значимом уровне, когда Т-клетки культивировали с клетками НЕК-293-B7-H4 по сравнению с клетками НЕК-293-WT в контрольной группе (паливизумаб) (t-критерий Стьюдента;  $P \leq 0,001$  и  $P \leq 0,05$ , соответственно). Обработка антителом 1D11 против B7-H4 или 1604(+K) (B7-H4\_2F9V18) не восстанавливала в значительной степени пролиферацию либо CD4<sup>+</sup> Т-клеток, либо CD8<sup>+</sup>Т-клеток. Таким образом, ХМТ-1604(+K) (B7-H4\_2F9V18) не ингибировало антипролиферативный эффект клеток НЕК-293-B7-H4 на сокультивируемые CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

**Пример 28: Связывание конъюгатов вариант антитела против B7-H4-цитотоксическое лекарственное средство с белком B7-H4 посредством ELISA**

**[885]** Связывание конъюгатов ADC с DAR 6, полученных из вариантов B4-H4\_2F9 ХМТ-1603(+K); конъюгата 3, B7-H4\_2F9V11, конъюгата 6, B7-H4\_2F9V17, конъюгата 7,

ХМТ-1604(+K); конъюгата **1-1** и конъюгата **8-1**, соответствующих неконъюгированных антител, несвязывающегося контрольного конъюгата ADC **9-1** и несвязывающегося контрольного mAb (паливизумаб) с белком B7-H4 посредством ELISA проводили, как описано в примере 23, за исключением того, что лунки блокировали посредством инкубации с блокирующим буфером (4% BSA в PBS) и использовали диапазон разведений (от 0,0013 нМ до 100нМ; 5-кратные серийные разведения в 1% BSA в PBS) тестируемых образцов B7-H4 и несвязывающихся контролей. В таблице 7 обобщенно представлены величины связывания ( $EC_{50}$ ).

**Таблица 7**

| <b>Тестируемые образцы</b>        | <b>Величины связывания B7-H4, <math>EC_{50}</math> (нМ)</b> |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| ХМТ-1603(+K)<br>B7-H4_2F9V7       | 0,27                                                        |
| Конъюгат <b>3</b><br>B7-H4_2F9V11 | 0,21<br>0,11                                                |
| Конъюгат <b>6</b><br>B7-H4_2F9V17 | 0,25<br>0,061                                               |
| Конъюгат <b>7</b>                 | 0,26                                                        |
| ХМТ-1604(+K)<br>B7-H4_2F9V18      | 0,12                                                        |
| Конъюгат <b>1-1</b>               | 0,23                                                        |
| 1D11                              | 0,52                                                        |
| Конъюгат <b>8-1</b>               | 0,41                                                        |
| Конъюгат <b>9-1</b>               | >100                                                        |
| Паливизумаб                       | >100                                                        |

**[886]** Как показано в таблице 7, величины  $EC_{50}$  для конъюгатов антитело-лекарственное средство, полученных с вариантами антител B4-H4\_2F9 ХМТ-1603(+K) (B7-H4\_2F9V7), B7-H4\_2F9V11 и ХМТ-1604(+K) (B7-H4\_2F9V18) и 1D11, имели сходные величины связывания (в пределах 2,5 раз) с соответствующим неконъюгированным антителом. Было показано, что связывание конъюгата **7** является более чем в 4 раза менее эффективным, чем у его неконъюгированного антитела B7-H4\_2F9V17. Отсутствие связывания, наблюдаемое для контрольных антител и их соответствующих ADC, указывает на специфичность связывания антител, нацеленных на B7-H4, и ADC.

**Пример 29: Связывание конъюгатов ХМТ-1603 (B7-H4\_2F9V7) и ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18) и цитотоксического лекарственного средства с белком B7-H4 человека посредством ELISA**

**[887]** Связывание белка B7-H4 человека посредством ХМТ-1603(+K) (B7-H4\_2F9V7), ХМТ-1604 (+K) (B7-H4\_2F9V18) и их соответствующих конъюгатов с

цитотоксическим лекарственным средством тестировали посредством ELISA, как описано в примере 23, за исключением того, что использовали диапазон разведений (от 0,0013 нМ до 100 нМ; 5-кратные серийные разведения в 1% BSA в PBS) тестируемых образцов. Тестируемые образцы представляли собой конъюгат **5**, конъюгат **4**, конъюгат **13**, конъюгат **2-1**, конъюгат **1-2** и конъюгат **12**. Контроли, использованные в этом испытании, включали несвязывающееся антитело и несвязывающиеся контрольные ADC: конъюгат **10**, конъюгат **9-2** и конъюгат **14** (долафлексин DAR10,9). В таблице 8 обобщенно представлены величины связывания ( $EC_{50}$ ).

Таблица 8

| Тестируемые образцы   | Величины связывания В7-Н4,<br>$EC_{50}$ (нМ) |
|-----------------------|----------------------------------------------|
| ХМТ-1603 В7-Н4_2F9V7  | 0,45                                         |
| Конъюгат <b>13</b>    | 0,76                                         |
| Конъюгат <b>4</b>     | 0,54                                         |
| Конъюгат <b>5</b>     | 0,51                                         |
| ХМТ-1604 В7-Н4_2F9V18 | 0,35                                         |
| Конъюгат <b>12</b>    | 0,53                                         |
| Конъюгат <b>1-2</b>   | 0,36                                         |
| Конъюгат <b>2-1</b>   | 0,28                                         |
| Конъюгат <b>9-2</b>   | >100                                         |
| Конъюгат <b>10</b>    | >100                                         |
| Конъюгат <b>14</b>    | >100                                         |
| Паливизумаб           | >100                                         |

**[888]** Как показано в таблице 8, величины  $EC_{50}$  для конъюгатов, полученных с вариантами антител В4-Н4\_2F9 ХМТ-1603 В7-Н4\_2F9V7 и ХМТ-1604 В7-Н4\_2F9V18, были сходными (в пределах двукратной величины) с их неконъюгированными антителами. Отсутствие связывания, наблюдаемое для контрольных антител, указывает на специфичность связывания антител, нацеленных на В7-Н4, и ADC.

**Пример 30: Связывание ХМТ-1604 В7-Н4\_2F9V18 и цитотоксических конъюгатов лекарственного средства с белками В7-Н4 из человека, обезьяны, крысы и мыши посредством ELISA**

**[889]** Связывание белка В7-Н4 из человека, обезьяны, крысы и мыши посредством ХМТ-1604 (В7Н4\_2F9V18) и соответствующих конъюгатов цитотоксического лекарственного средства тестировали посредством ELISA, как описано в примере 23. Белки, использованные в этих испытаниях, представляли собой: В7-Н4 человека (R&D Systems; 6576-B7-050), В7-Н4 обезьяны (Creative Biomart; VTCN1-1519R), крысы (R&D Systems 10085-B7) и мыши (Creative Biomart; VTCN1-1519R). Тестируемые образцы представляли

собой конъюгат 2-1, конъюгат 1-2 и конъюгат 12. Контроли, использованные в этом испытании, включали несвязывающееся антитело hu-IgG1 и несвязывающиеся контрольные ADC: конъюгат **10**, конъюгат **9-2** и конъюгат **14**. В таблице 9 обобщенно представлены величины связывания ( $EC_{50}$ ) для В7-Н4 человека, обезьяны, крысы и мыши. Результаты представляют собой среднее значение для двух испытаний.

Таблица 9

|                            | <b>Средние величины связывания В7-Н4,<br/><math>EC_{50}</math> (нМ)</b> |                 |              |             |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------|-------------|
| <b>Тестируемые образцы</b> | <b>Человек</b>                                                          | <b>Обезьяна</b> | <b>Крыса</b> | <b>Мышь</b> |
| ХМТ-1604<br>В7-Н4_2F9V18   | 0,24                                                                    | 0,17            | 0,19         | 0,30        |
| Конъюгат <b>12</b>         | 0,30                                                                    | 0,24            | 0,15         | 0,50        |
| Конъюгат <b>1-2</b>        | 0,21                                                                    | 0,21            | 0,15         | 0,38        |
| Конъюгат <b>2-1</b>        | 0,20                                                                    | 0,17            | 0,13         | 0,52        |
| Конъюгат <b>9-2</b>        | >100                                                                    | >100            | >100         | >100        |
| Конъюгат <b>10</b>         | >100                                                                    | >100            | >100         | >100        |
| Конъюгат <b>14</b>         | >100                                                                    | >100            | >100         | >100        |
| Паливизумаб                | >100                                                                    | >100            | >100         | >100        |

**[890]** Как показано в таблице 9, величины связывания для ХМТ-1604 (В7Н4\_2F9V18) и соответствующих конъюгатов цитотоксического лекарственного средства: конъюгата **12**, конъюгата **1-2** и конъюгата **2-1** были сходными друг с другом среди четырех протестированных видов. Диапазон величин  $EC_{50}$  находился между 0,20 и 0,30 нМ для связывания с белком В7-Н4 человека, между 0,17 и 0,24 нМ для белка обезьяны, между 0,13 и 0,18 нМ для белка крысы, и между 0,30 и 0,52 нМ для белка мыши. Контрольные конъюгаты цитотоксического лекарственного средства продемонстрировали отсутствие связывания с белком В7-Н4.

**Пример 31: Аффинность связывания ХМТ-1604 В7-Н4\_2F9V18 и конъюгатов цитотоксического лекарственного средства с белком В7-Н4 человека посредством Octet**

**[891]** Кинетику связывания двух партий ХМТ-1604 В7-Н4\_2F9V18 - партия 1, и его конъюгатов ХМТ-цитотоксическое лекарственное средство: конъюгат **2-1**, конъюгат **1-2** и конъюгат **12**, и ХМТ-1604 В7-Н4\_2F9V18 - партия 2 и его конъюгатов с цитотоксическим лекарственным средством: конъюгат **2-2**, конъюгат **1-3**, с В7-Н4 человека оценивали посредством биослойной интерферометрии (Octet), как описано в примере 23. Результаты обобщенно представлены в таблице 10 для В7-Н4 человека, обезьяны, крысы и мыши. Результаты для ХМТ-1604 В7Н4\_2F9V18 - партия 1, конъюгата **12**, конъюгата **1-2** и конъюгата **2-1** представляют собой средние значения для трех испытаний, и ХМТ-1604 В7-

H4\_2F9V18 - партия 2, конъюгат **2-2** и конъюгат **1-3** анализировали один раз.

**Таблица 10**

| Тестируемые образцы                  | $K_d$ (M)               | $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ )  |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| XMT-1604<br>B7H4_2F9V18,<br>партия 1 | $2,51E-08 \pm 1,08E-08$ | $8,13E+04 \pm 1,64E+04$     | $1,94E-03 \pm 5,73E-04$ |
| Конъюгат <b>12</b>                   | $2,29E-08 \pm 1,22E-08$ | $8,31E+04 \pm 1,20E+04$     | $1,81E-03 \pm 8,56E-04$ |
| Конъюгат <b>1-2</b>                  | $1,87E-08 \pm 9,11E-09$ | $1,09E+05 \pm 1,68E+04$     | $1,93E-03 \pm 7,14E-04$ |
| Конъюгат <b>2-1</b>                  | $2,56E-08 \pm 2,10E-08$ | $1,02E+05 \pm 5,75E+04$     | $1,80E-03 \pm 5,50E-04$ |
| XMT-1604<br>B7H4_2F9V18,<br>партия 2 | $2,15E-08$              | $9,34E+04$                  | $2,01E-03$              |
| Конъюгат <b>1-3</b>                  | $2,51E-08$              | $8,51E+04$                  | $2,14E-03$              |
| Конъюгат <b>2-2</b>                  | $2,31E-08$              | $1,06E+05$                  | $2,44E-03$              |

[892] Как показано в таблице 10, величины  $K_d$ ,  $k_{on}$  и  $k_{off}$  конъюгатов антитела XMT-1604 (B7H4\_2F9V18) и цитотоксического лекарственного средства были сходными с неконъюгированными антителами. Для XMT-1604 B7H4\_2F9V18 - партия 1, и его конъюгатов: конъюгата **12**, конъюгата **1-2** и конъюгата **2-1**, величины  $K_d$  находятся в диапазоне от  $1,87E-08$  до  $2,56E-08$  M, величины  $k_{on}$  находятся в диапазоне от  $8,13E+04$  до  $1,09E+05$   $M^{-1}s^{-1}$  и величины  $k_{off}$  находятся в диапазоне от  $1,80E-03$  до  $1,94E-03$   $s^{-1}$ . Для XMT-1604 B7H4\_2F9V18 - партия 2, и его конъюгатов с цитотоксическим лекарственным средством: конъюгата **1-3** и конъюгата **2-2**, величины  $K_d$  составляют от  $2,15E-08$  до  $2,51E-08$  M, величины  $k_{on}$  составляют от  $8,51E+04$  до  $1,06E+05$ , и величины  $k_{off}$  составляют от  $2,01E-03$  до  $2,44E-03$ .

**Пример 32: Клеточный анализ связывания для конъюгатов XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) B7-H4 с цитотоксическим лекарственным средством посредством FACS**

[893] Связывание на клеточной поверхности B7-H4 человека посредством XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) и его конъюгатов: конъюгата **2-1**, конъюгата **1-2** и конъюгата **12** оценивали посредством проточной цитометрии. Контроли, использованные в этом испытании, включали несвязывающееся антитело hu-IgG1, паливизумаб и ADC: конъюгат **10**, конъюгат **9-2** и конъюгат **14**.

[894] Связывание тестируемых образцов с клеточными линиями MX-1 и HEK-293, стабильно трансфицированными B7-H4 человека, и нетрансфицированными клетками

НЕК-293 оценивали с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), как описано в примере 24, за исключением того, что тестируемые образцы оценивали в концентрации от 0,0013 нМ до 100 нМ; 5-кратные серийные разведения в 1% BSA в PBS. Клетки МХ-1 выращивали, как описано в примере 24. Клетки НЕК-293-В7-Н4 выращивали в ЕМЕМ (ATCC), 10% FBS, 1% пенициллине/стрептомицине и 3 мкг/мл пурамицина (Life Technologies) и нетрансфицированные клетки НЕК-293 выращивали в ЕМЕМ, 10% FBS, 1% пенициллине/стрептомицине. В таблице 11 обобщенно представлены величины ЕС<sub>50</sub> для тестируемых образцов на поверхности клеток МХ-1, НЕК-293-В7-Н4 и НЕК-293. Результаты представляют собой средние значения для экспериментов в двух повторениях для каждого протестированного образца.

Таблица 11

| Тестируемый образец   | Связывание МХ-1, ЕС <sub>50</sub> , нМ | Связывание НЕК-293-В7-Н4, ЕС <sub>50</sub> , нМ | Связывание нетрансфицированных НЕК-293, ЕС <sub>50</sub> , нМ |
|-----------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ХМТ-1604 В7-Н4_2F9V18 | 1,32                                   | 2,45                                            | >100                                                          |
| Конъюгат <b>12</b>    | 2,16                                   | 2,37                                            | >100                                                          |
| Конъюгат <b>1-2</b>   | 1,12                                   | 1,84                                            | >100                                                          |
| Конъюгат <b>2-1</b>   | 1,18                                   | 1,57                                            | >100                                                          |
| Конъюгат <b>9-2</b>   | >100                                   | >100                                            | >100                                                          |
| Конъюгат <b>10</b>    | >100                                   | >100                                            | >100                                                          |
| Конъюгат <b>14</b>    | >100                                   | >100                                            | >100                                                          |
| Паливизумаб           | >100                                   | >100                                            | >100                                                          |

**[895]** Как показано в таблице 11, связывание ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) с клетками МХ-1 и НЕК-293-В7-Н4 было в высокой степени сходным со связыванием его конъюгатов с цитотоксическим средством: конъюгата **12**, конъюгата **1-2** и конъюгата **2-1** (во всех случаях в пределах двукратной величины). Не связывающееся контрольное антитело и его конъюгаты с цитотоксическим лекарственным средством не связывались с клетками МХ-1 или НЕК-293-В7-Н4, и ни один из тестируемых образцов не связывался с нетрансфицированными клетками НЕК-293. Эти результаты указывают на специфическое мощное связывание ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) и его конъюгатов с цитотоксическим средством с В7-Н4 на клеточной поверхности.

**Пример 33: Анализ цитотоксичности для конъюгатов ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18)-цитотоксическое лекарственное средство**

**[896]** Антипролиферативную активность конъюгатов ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) с цитотоксическим лекарственным средством тестировали в анализах цитотоксичности.

Тестируемые конъюгаты цитотоксического лекарственного средства представляли собой конъюгат **2-1**, конъюгат **1-2**, конъюгат **1-3** и конъюгат **12**. Контроли, использованные в этом испытании, включали несвязывающиеся контрольные конъюгаты: конъюгат **10**, конъюгат **9-2** и конъюгат **14**.

[897] Анализ цитотоксичности проводили с использованием НЕК-293-B7-H4 и нетрансфицированных клеток НЕК-293 *in vitro* с использованием CellTiter-Glo® (Promega Corp). Клетки высевали с плотностью 2000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с белыми стенками (объем), и им позволяли прикрепляться в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали с возрастающими концентрациями тестируемых образцов. Через трое суток или через пять суток для клеток САМА-1 в лунки добавляли реагент CellTiter-Glo® при комнатной температуре. Люминесцентный сигнал определяли через 10 минут с использованием устройства для считывания планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices). Кривые доза-эффект строили с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Величины ЕС<sub>50</sub> определяли из четырехпараметрической аппроксимации кривой. В таблице 12 обобщенно представлены величины ЕС<sub>50</sub>. Представленные величины представляют собой средние значения для двух повторений экспериментов для каждого тестируемого образца.

Таблица 12

| Тестируемый образец | Цитотоксичность в отношении САМА-1, ЕС <sub>50</sub> , нМ | Цитотоксичность в отношении НЕК-293-B7-H4, ЕС <sub>50</sub> , нМ | Цитотоксичность в отношении нетрансфицированных НЕК-293, ЕС <sub>50</sub> , нМ |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Конъюгат <b>12</b>  |                                                           | 0,82                                                             | 139                                                                            |
| Конъюгат <b>1-2</b> |                                                           | 0,85                                                             | 122                                                                            |
| Конъюгат <b>1-3</b> | 0,052                                                     |                                                                  |                                                                                |
| Конъюгат <b>2-1</b> |                                                           | 0,45                                                             | 145                                                                            |
| Конъюгат <b>9-2</b> | 11,8                                                      | 144                                                              | 190                                                                            |
| Конъюгат <b>10</b>  |                                                           | 299                                                              | 190                                                                            |
| Конъюгат <b>14</b>  |                                                           | 219                                                              | 105                                                                            |

[898] Как показано в таблице 12, для клеток САМА-1 конъюгат **1-3** был более чем в 200 раз более эффективным, чем конъюгат **9-2**. Для клеток НЕК-293-B7-H4 конъюгат **12**, конъюгат **1-2** и конъюгат **2-1** продемонстрировали сходную цитотоксическую эффективность (в пределах двукратной величины), в то время как несвязывающиеся контрольные конъюгаты, конъюгат **9-2**, конъюгат **10** и конъюгат **14** были более чем в 100 раз более эффективными. В нетрансфицированных клетках НЕК-293, которые не экспрессируют B7-H4, все конъюгаты продемонстрировали сходные величины ЕС<sub>50</sub> (в пределах двукратной величины), которые превышали 100 нМ. Результаты этих испытаний указывают на специфическую мощную индукцию клеточной цитотоксичности

конъюгатами В7-Н4.

**Пример 34: Связывание конъюгатов ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) и 1D11 и агониста STING с рекомбинантным белком В7-Н4 человека посредством ELISA**

[899] Связывание ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) и его конъюгата-агониста STING: конъюгата **15** и конъюгата **19**, с рекомбинантным белком В7-Н4 человека проводили посредством ELISA, как описано в примере 23, за исключением того, что лунки блокировали посредством инкубации с блокирующим буфером (3% BSA в PBST), и использовали диапазон разведений тестируемых образцов от 0 до 100 нМ (4-кратные серийные разведения в 1% BSA в PBST). Другие тестируемые образцы в этом испытании представляли собой антитело 1D11 и его конъюгат-агонист STING (конъюгат **16**, конъюгат **18** и конъюгат **20**), несвязывающееся антитело (паливизумаб) и его конъюгат-агонист STING, конъюгат **17**. Величины связывания ( $EC_{50}$ ) обобщенно представлены в таблице 13.

**Таблица 13**

| Тестируемый образец | Связывание с белком В7-Н4 человека, $EC_{50}$ , нМ |
|---------------------|----------------------------------------------------|
| 1D11                | 0,86                                               |
| Конъюгат <b>16</b>  | 1,08                                               |
| В7-Н4_2F9V18        | 0,50                                               |
| Конъюгат <b>15</b>  | 0,99                                               |
| Конъюгат <b>20</b>  | 1,54                                               |
| Конъюгат <b>18</b>  | 0,76                                               |
| Конъюгат <b>19</b>  | 0,47                                               |
| Паливизумаб         | >100                                               |
| Конъюгат <b>17</b>  | >100                                               |

[900] Как показано в таблице 13, величины  $EC_{50}$  конъюгата **15**, конъюгата **16**, конъюгата **18**, конъюгата **19** и конъюгата **20**, которые составили 0,991,08 нМ, 0,76, 0,47 и 1,54, соответственно, были сравнимыми, в то время как контрольное антитело и его конъюгат не продемонстрировали никакого связывания. Эти результаты указывают на специфическое связывание ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) и его конъюгатов с белком В7-Н4 человека.

**Пример 35: Клеточный анализ связывания конъюгатов ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) и 1D11 с STING посредством FACS**

[901] Связывание с клеточной поверхностью ХМТ-1604 (В7-Н4\_2F9V18) и его конъюгата (конъюгат **15**, конъюгат **15-1** и конъюгат **20**) на клетках MX-1 оценивали с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия). Контроли, использованные в этом испытании, включали антитело 1D11 и его конъюгаты (конъюгат **16** и конъюгат **19**) и несвязывающееся антитело (паливизумаб) и его конъюгат, конъюгат **17**. Эксперимент проводили, как описано в примере 24, за



исключением того, что клетки инкубировали на льду в течение 2 часов с диапазоном концентраций от 0,0122 нМ до 200 нМ (4-кратные серийные разведения) тестируемых образцов в общем объеме среды 100 мкл с добавлением 6% сыворотки козы. Клетки промывали ледяным PBS (2х), осаждали при  $1000 \times \text{RCF}$  между стадиями промывания и ресуспендировали в RPMI-1640 с 2% сывороткой козы (100 мкл) и вторичным флуоресцентно меченным антителом, Alexa Fluor® 647-меченным антителом козы против IgG человека (6 мкг/мл, Life Technologies) в течение 1 часа на льду. Клетки промывали ледяным PBS (2х) и ресуспендировали в ледяном PBS с 1% параформальдегидом (100 мкл). Флуоресценцию на клетку определяли посредством анализа 10000 клеток для каждой обработки на проточном цитометре. В таблице 14 обобщенно представлены величины  $\text{EC}_{50}$  антител и их соответствующих конъюгатов с агонистом STING для связывания с клетками MX-1.

Таблица 14

| Тестируемый образец | Связывание с клетками MX-1, $\text{EC}_{50}$ , нМ |
|---------------------|---------------------------------------------------|
| 1D11                | 8,83                                              |
| Конъюгат 16         | 7,51                                              |
| B7-H4_2F9V18        | 1,13                                              |
| Конъюгат 15         | 1,70                                              |
| Конъюгат 20         | 1,69                                              |
| Конъюгат 15-1       | 0,99                                              |
| Конъюгат 19         | 3,49                                              |
| Паливизумаб         | >200                                              |
| Конъюгат 17         | >200                                              |

[902] Как показано в таблице 14, связывание XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) и его конъюгата (конъюгат 15, конъюгат 15-1 и конъюгат 20) с клетками MX-1 было сравнимым, и их величины  $\text{EC}_{50}$  превышали величины, наблюдаемые для антитела 1D11 и его конъюгатов (конъюгат 16 и конъюгат 19) (в пределах 2-4-кратной величины). Несвязывающееся контрольное антитело (паливизумаб) и его конъюгат, конъюгат 17, не связывались с клетками MX-1. Эти результаты указывают на специфическое низкое нМ связывание B7-H4\_2F9V18 и его конъюгатов: конъюгата 15, конъюгата 15-1 и конъюгата 20 с B7-H4 клеточной поверхностью.

**Пример 36: Функциональный анализ активации STING *in vitro* для конъюгатов XMT-1604 (B7-H4\_2F9V18) и 1D11 с STING с использованием сокультур злокачественные клетки/ клетки с люциферазным репортером THP1**

[903] Индукция каскада STING в иммунных клетках посредством нацеленных на B7-H4 конъюгатов с агонистом STING оценивали посредством анализа сокультуры злокачественных клеток/THP1-IRF3-люциферазных репортерных клеток. Клетки MX-1

высеивали в 96-луночные планшеты для культивирования поверхностных тканей CellBind (17000 клеток/лунка), и им позволяли прикрепляться в течение 4 часов в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллином/стрептомицином. Диапазон разведений (от 0,01 нМ до 100 нМ на основе груза; 4-кратные серийные разведения в среде для роста) конъюгатов: конъюгат **15**, конъюгат **16**, конъюгат **19**, конъюгат **20**, конъюгат **15-1**, конъюгат **15-2** и конъюгат **17** или свободный агонист STING (полученный, как описано в US 11155567) добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки THP1-Dual™ Cells (InvivoGen) (50000 клеток) добавляли в каждую лунку и инкубацию продолжали в течение 24 часов при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Супернатанты клеточной культуры (20 мкл) из каждого инкубированного образца добавляли к ресуспендированному QUANTI-Luc (InvivoGen) (50 мкл) и сразу определяли люминесцентный сигнал с использованием устройства для считывания планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices). Величины EC<sub>50</sub> определяли из кривой доза-эффект. В таблице 15 приведены величины EC<sub>50</sub> для клеток THP1-Dual, сокультивированных со злокачественными клетками MX-1.

Таблица 15

| Тестируемый образец  | Сокультуры клеток THP1-Dual /MX-1, EC <sub>50</sub> , нМ |
|----------------------|----------------------------------------------------------|
| Конъюгат <b>16</b>   | 0,53                                                     |
| Конъюгат <b>15</b>   | 0,34                                                     |
| Конъюгат <b>19</b>   | 0,29                                                     |
| Конъюгат <b>20</b>   | 0,85                                                     |
| Конъюгат <b>15-1</b> | 0,18                                                     |
| Конъюгат <b>15-2</b> | 0,46                                                     |
| Конъюгат <b>17</b>   | >100                                                     |
| Агонист STING        | >100                                                     |

[904] Как показано в таблице 15, конъюгаты агониста STING: конъюгат **15**, конъюгат **16**, конъюгат **19**, конъюгат **20**, конъюгат **15-1**, конъюгат **15-2**, продемонстрировали сходную активность люциферазного репортера с величинами EC<sub>50</sub> ниже 1 нМ и по меньшей мере в 200 раз более низкими, чем у конъюгата несвязывающегося антитела (паливизумаб), конъюгата **17**, и свободного агониста STING, соответственно. Таким образом, конъюгат B7-H4\_2F9V18-агонист STING продемонстрировал специфичность к мишени и роль опосредуемой Fc-рецептором доставки к иммунным клеткам (THP1) для активности.

**Пример 37: Ответ роста опухоли на введение конъюгатов B7-H4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство в модели с ксенотрансплантатами MX-1 TNBC на мышах**

[905] Самкам бестимусных мышей nude имплантировали подкожно фрагменты ксенотрансплантата рака молочной железы человека MX-1 (~1 мм<sup>3</sup> на мыш). Животных

случайным образом распределяли на группы введения, когда объемы опухоли составляли 63-196 мм<sup>3</sup> (среднее значение=119-123 мм<sup>3</sup>/группа) (n=10/группа). Носитель, конъюгат **9-1** (2,46/0,075 или 4,92/0,150 мг/кг), конъюгат **11** (2,28/0,075 или 4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **3** (2,30/0,075 или 4,60/0,150 мг/кг), конъюгат **6** (2,30/0,075 или 4,61/0,150 мг/кг), 3740 (2,30/0,075 или 4,60/0,150 мг/кг) или конъюгат **1-1** (2,30/0,075 или 4,60/0,150 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Не было отмечено значительного снижения массы тела или изменения результатов клинических наблюдений.

**[906]** На **фиг.7** приведены результаты для объемов опухоли у имеющих опухоль MX-1 мышей, которым вводили конъюгаты B7-H4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство: конъюгат **9-1**, конъюгат **11**, конъюгат **3**, конъюгат **6**, конъюгат **7** и конъюгат **1-1**. Введение конъюгата **11** 2,28/0,075 мг/кг привело к 4 CR. Введение конъюгата **3** 2,30/0,075 мг/кг привело к 1 PR и 1 CR. Введение конъюгата **6** 2,30/0,075 мг/кг привело к 1 PR, 2 CR, 1 TFS. Введение конъюгата **7** 2,30/0,075 мг/кг привело к 1 PR, 3 CR, 1 TFS. Введение конъюгата **1-1** 2,30/0,075 мг/кг привело к 2 PR, 1 CR, 1 TFS. Введение конъюгата **11** 4,56/0,150 мг/кг привело к 1 PR, 9 CR, 4 TFS. Введение конъюгата **3** 4,60/0,150 мг/кг привело к 10 CR, 6 TFS. Введение конъюгата **6** 4,61/0,150 мг/кг привело к 10 CR, 10 TFS. Введение конъюгата **7** 4,60/0,150 мг/кг привело к 10 CR, 8 TFS. Введение конъюгата **1-1** 4,60/0,150 мг/кг привело к 10 CR, 7 TFS. Никакие другие введения не индуцировали ответ в виде регрессии.

**Пример 38: Ответ роста опухоли на введение конъюгатов B7-H4\_2F9V18-цитотоксическое средство в модели с ксенотрансплантатом MX-1 TNBC у мышей**

**[907]** Самкам бестимусных мышей nude имплантировали подкожно фрагменты ксенотрансплантата рака молочной железы человека MX-1 (~1 мм<sup>3</sup> на мышшь). Животных случайным образом распределяли на группы введения, когда объемы опухоли составляли 75-221 мм<sup>3</sup> (среднее значение=123,5-126,8 мм<sup>3</sup>/группа) (n=10/группа). Носитель, конъюгат **14** (2,57/0,150 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **10** (14,37/0,150 мг/кг), конъюгат **12** (2,26/0,150 или 0,75/0,050 мг/кг), конъюгат **1-2** (5,37/0,177, 2,33/0,077 или 1,79/0,059 мг/кг), конъюгат **2-1** (13,45/0,150, 4,60/0,050 или 2,30/0,025 мг/кг) или ХМТ-1604 B7-H4\_2F9V18 (13,80/0 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Не отмечалось значительного снижения массы тела или изменения результатов клинических наблюдений.

**[908]** На **фиг.8** приведены результаты для объемов опухоли у имеющих опухоль MX-1 мышей, которым вводили конъюгаты B7-H4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство: конъюгат **14**, конъюгат **9-2**, конъюгат **10**, конъюгат **12**, конъюгат **1-2**, конъюгат **2-1** и ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18). Введение конъюгата **14** 2,57/0,150 мг/кг привело к 1 CR, 1 TFS. Введение конъюгата **12** 2,26/0,150 мг/кг привело к 1 PR. Введение конъюгата **1-2** 5,37/0,177 мг/кг привело к 10 CR, 8 TFS. Введение конъюгата **1-2** 2,33/0,077 мг/кг привело к 1 PR, 2 CR, 2 TFS. Введение конъюгата **1-2** 1,79/0,050 мг/кг привело к 1 CR. Никакие другие введения не индуцировали ответ в виде регрессии.

**Пример 39: Ответ роста опухоли на введение конъюгатов B7-H4\_2F9V18-цитотоксическое лекарственное средство в модели с ксенотрансплантатом происходящих из пациента НВСх-19**

[909] Самкам бестимусных мышей имплантировали подкожно фрагменты ксенотрансплантата рака молочной железы НВСх-19 (4×3 мм на мышь). Животных случайным образом распределяли на группы введения, когда объемы опухоли составляли 75-221 мм<sup>3</sup> (среднее значение=123,5-126,8 мм<sup>3</sup>/группа) (n=10/группа). Носитель, конъюгат **1-2** (1,79/0,059 или 5,37/0,177 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **2-1** (4,60/0,050 или 13,45/0,150 мг/кг) или конъюгат **10** (14,37/0,150 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Не отмечалось значительного снижения массы тела или изменения результатов клинических наблюдений.

[910] На **фиг.9** представлены результаты объемов опухолей у мышей, имеющих опухоль НВСх-19, которым вводили конъюгаты B7-H4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство: конъюгат **9-2**, конъюгат **10**, конъюгат **1-2** и конъюгат **2-1**. Введение конъюгата **1-2** (5,37/0,177 мг/кг) привело к 7 TFS, показав, что этот конъюгат был наиболее эффективным. Никакие другие введения не индуцировали противоопухолевый ответ.

**Пример 40: Ответ роста опухоли на введение конъюгатов B7-H4\_2F9V18-цитотоксическое лекарственное средство в модели с ксенотрансплантатом происходящих из пациента НВСх-24**

[911] Самкам бестимусных мышей имплантировали подкожно фрагменты ксенотрансплантата рака молочной железы НВСх-24 (4×3 мм на мышь). Животных случайным образом распределяли на группы введения, когда объемы опухоли составляли 62,5-256 мм<sup>3</sup> (среднее значение=141,40-149,25 мм<sup>3</sup>/группа) (n=10/группа). Носитель, конъюгат **14** (2,57/0,150 мг/кг), конъюгат **9-2** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **10** (14,37/0,150 мг/кг), конъюгат **12** (2,26/0,150 или 0,75/0,050 мг/кг), конъюгат **1-2** (4,56/0,150, 2,30/0,076 или 1,52/0,05 мг/кг), конъюгат **2-1** (13,45/0,150, 4,60/0,050 или 2,30/0,025 мг/кг) или ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18) (13,80/0 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Не отмечалось значительного снижения массы тела или изменения результатов клинических наблюдений.

[912] На **фиг.10** приведены результаты для объемов опухолей у имеющих опухоль НВСх-24 мышей, которым вводили конъюгаты B7-H4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство: конъюгат **14**, конъюгат **9-2**, конъюгат **10**, конъюгат **12**, конъюгат **1-2**, конъюгат **2-1** и ХМТ-1604 (B7-H4\_2F9V18). Введение конъюгата **12** (2,26/0,150 мг/кг) привело к 3 PR, 6 CR, 1 TFS. Введение конъюгата **1-2** (1,52/0,050 мг/кг) привело к 5 TFS. Введение конъюгата **1-2** (2,30/0,076 мг/кг) привело к 3 PR и 4 CR. Введение конъюгата **1-2** (4,56/0,150 мг/кг) привело к 10 CR и 3 TFS. Введение конъюгата **2-1** (4,60/0,050 мг/кг) привело к 5 TS. Введение конъюгата **2-1** (13,80/0,150 мг/кг) привело к 7 TS. Никакие другие введения не индуцировали противоопухолевый ответ.

**Пример 41: Экспозиция в плазме общего лекарственного средства у мышей с**

**опухолью MX-1 после введения конъюгатов B7-H4\_2F9V18-цитотоксическое лекарственное средство**

[913] Самкам бестимусных мышей nude имплантировали подкожно фрагменты опухоли MX-1 (n=4 для каждой группы). Конъюгат **12** (2,26/0,150 или 0,75/0,050 мг/кг), конъюгат **1-2** (5,37/0,177, 2,33/0,077 или 1,79/0,059 мг/кг) или конъюгат **2-1** (13,80/0,150, 4,60/0,050, или 2,30/0,025 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Образцы крови из надреза хвоста (0,04 мл) получали в следующие моменты времени: 15 минут, 24 часа (сутки 2), 72 часов (сутки 4), 168 часов (сутки 8), 240 часов (сутки 11) и 336 часов (сутки 15) после дозирования. Из крови получали плазму с антикоагулянтом K<sub>2</sub>EDTA, использованным для взятия. Образцы быстро замораживали и хранили при -80°C до транспортировки.

[914] Тотальное антитело определяли с использованием сэндвич-иммуноанализа MSD-ECL. Конъюгированное лекарственное средство определяли посредством LC-MS после иммунного захвата образцов с использованием универсальных магнитных микроносителей с антителом против Fc человека и обрабатывали гидроксидом натрия для высвобождения конъюгированного лекарственного средства. В таблицах 16 и 17 приведены параметры РК для тотального общего и конъюгированного лекарственного средства, соответственно.

**Таблица 16**

| Тестируемые образцы | Доза мAb/груз (мг/кг) | C <sub>max</sub> (нг/мл) | Время полужизни (сутки) | AUC <sub>∞</sub> (нг/мл*сутки) | Cl <sub>obs</sub> (мл/сутки/кг) | V <sub>ss_obs</sub> (мл/кг) |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Конъюгат <b>12</b>  | 2,26/0,150            | 39700                    | 3,48                    | 122000                         | 18,6                            | 86,7                        |
| Конъюгат <b>12</b>  | 0,75/0,050            | 12900                    | 2,16                    | 27900                          | 27,5                            | 79,2                        |
| Конъюгат <b>1-2</b> | 5,38/0,177            | 97600                    | 7,79                    | 579000                         | 9,99                            | 98,0                        |
| Конъюгат <b>1-2</b> | 2,33/0,077            | 38800                    | 4,96                    | 173000                         | 14,4                            | 92,0                        |
| Конъюгат <b>1-2</b> | 1,79/0,059            | 26900                    | 2,73                    | 81000                          | 24,5                            | 94,4                        |
| Конъюгат <b>2-1</b> | 13,45/0,150           | 236000                   | 8,93                    | 1240000                        | 11,2                            | 128                         |
| Конъюгат <b>2-1</b> | 4,48/0,050            | 77300                    | 4,28                    | 287000                         | 17,9                            | 98,9                        |

| Тестируемые образцы | Доза<br>мАб/груз<br>(мг/кг) | С <sub>тах</sub><br>(нг/мл) | Время полужизни<br>(сутки) | AUC <sub>∞</sub><br>(нг/мл*сутки) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/сутки/кг) | Vss <sub>obs</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Конъюгат 2-1        | 2,24/0,025                  | 33500                       | 3,08                       | 104000                            | 23,0                               | 104                           |

Таблица 17

| Тестируемые образцы | Доза<br>мАб/груз<br>(мг/кг) | С <sub>тах</sub><br>(нг/мл) | Время полужизни<br>(сутки) | AUC <sub>∞</sub><br>(нг/мл*сутки) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/сутки/кг) | Vss <sub>obs</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| Конъюгат 12         | 2,26/0,150                  | 3010                        | 2,78                       | 6960                              | 21,6                               | 78,6                          |
| Конъюгат 12         | 0,75/0,050                  | 1030                        | 2,68                       | 1980                              | 25,6                               | 78,9                          |
| Конъюгат 1-2        | 5,38/0,177                  | 3030                        | 6,23                       | 14200                             | 12,9                               | 103                           |
| Конъюгат 1-2        | 2,33/0,077                  | 1330                        | 3,89                       | 4830                              | 16,6                               | 86,1                          |
| Конъюгат 1-2        | 1,79/0,059                  | 887                         | 3,12                       | 2530                              | 25,0                               | 102                           |
| Конъюгат 2-1        | 13,45/0,150                 | 2630                        | 6,44                       | 11500                             | 13,1                               | 110                           |
| Конъюгат 2-1        | 4,48/0,050                  | 923                         | 3,52                       | 2900                              | 18,8                               | 86,2                          |
| Конъюгат 2-1        | 2,24/0,025                  | 438                         | 3,24                       | 1210                              | 21,7                               | 91,2                          |

[915] Для общего антитела, конъюгат 12, конъюгат 1-2 и конъюгат 2-1, по-видимому, имеют пропорциональную дозе С<sub>тах</sub>. Все протестированные образцы, по-видимому, демонстрируют снижение клиренса по мере увеличения доз. Конъюгат 1-2 имеет сравнимый клиренс с конъюгатом 2-1 при разных уровнях доз, но тем не менее, низкую экспозицию (AUC) антитела вследствие различия DAR и равного дозирования груза.

[916] Для конъюгированного с антителом лекарственного средства конъюгат 12, конъюгат 1-2 и конъюгат 2-1, по-видимому, имеют пропорциональную дозе С<sub>тах</sub>. Было выявлено, что конъюгат 12 при дозах груза 0,15 мг/кг и 0,05 мг/кг имеет более низкую экспозицию и более быстрый клиренс по сравнению с конъюгатом 1-2 и конъюгатом 2-1.

Конъюгат **1-2** имеет сравнимую экспозицию и клиренс с конъюгатом **2-1** при разных уровнях доз.

**Пример 42: Экспозиция в плазме общего лекарственного средства у мышей с опухолью MX-1 после введения конъюгатов В7-Н4\_2F9-цитотоксическое лекарственное средство**

[917] Самкам бестимусных мышей nude имплантировали подкожно фрагменты опухоли MX-1 (n=4 для каждой группы). Носитель, конъюгат **11** (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат **3** (4,60/0,150 мг/кг), конъюгат **6** (4,61/0,150 мг/кг), 3740 (4,60/0,150 мг/кг) или конъюгат **1-1** (4,60/0,150 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Образцы крови из надреза хвоста (0,04 мл) получали в следующие моменты времени: 15 минут, 24 часа (сутки 2), 72 часов (сутки 4), 168 часов (сутки 8), 240 часов (сутки 11) и 336 часов (сутки 15) после дозирования. Из крови получали плазму с антикоагулянтом K<sub>2</sub>EDTA, использованным для взятия. Образцы быстро замораживали и хранили при -80°C до транспортировки.

[918] Тотальное антитело определяли с использованием сэндвич-иммуноанализа MSD-ECL. Общее лекарственное средство определяли посредством LC-MS после прямой обработки образцов гидроксидом натрия для высвобождения конъюгированного лекарственного средства. В таблице 18 и 19 приведены параметры PK для общего антитела и общего лекарственного средства, соответственно.

**Таблица 18**

| Тестируемые образцы | Доза мAb/груз (мг/кг) | С <sub>max</sub> (нг/мл) | Время полу-жизни (сутки) | AUC <sub>∞</sub> (нг/мл*сутки) | Cl <sub>obs</sub> (мл/сутки/кг) | V <sub>ss_obs</sub> (мл/кг) |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Конъюгат <b>11</b>  | 4,55/0,150            | 70700                    | 7,19                     | 413000                         | 11,0                            | 110                         |
| Конъюгат <b>3</b>   | 4,60/0,150            | 80800                    | 8,12                     | 512000                         | 8,98                            | 103                         |
| Конъюгат <b>6</b>   | 4,61/0,150            | 87500                    | 12,6                     | 766000                         | 6,02                            | 105                         |
| Конъюгат <b>7</b>   | 4,60/0,150            | 84500                    | 9,93                     | 558000                         | 8,24                            | 111                         |
| Конъюгат <b>1-1</b> | 4,60/0,150            | 78500                    | 7,35                     | 436000                         | 10,5                            | 107                         |

**Таблица 19**

| Тестируемые образцы | Доза мAb/груз (мг/кг) | С <sub>max</sub> (нг/мл) | Время полу-жизни (сутки) | AUC <sub>∞</sub> (нг/мл*сутки) | Cl <sub>obs</sub> (мл/сутки/кг) | V <sub>ss_obs</sub> (мл/кг) |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Конъюгат <b>11</b>  | 4,55/0,150            | 2530                     | 5,29                     | 11400                          | 13,1                            | 95,7                        |

|              |            |      |      |       |      |      |
|--------------|------------|------|------|-------|------|------|
| Конъюгат 3   | 4,60/0,150 | 2450 | 5,40 | 11300 | 13,3 | 99,7 |
| Конъюгат 6   | 4,61/0,150 | 2560 | 7,74 | 15200 | 9,86 | 103  |
| Конъюгат 7   | 4,60/0,150 | 2530 | 5,51 | 14500 | 10,4 | 82,6 |
| Конъюгат 1-1 | 4,60/0,150 | 2480 | 5,40 | 12100 | 12,4 | 94,0 |

[919] Для общего антитела все протестированные образцы имели приблизительно сравнимую  $C_{\max}$ , клиренс и экспозицию, выраженные в качестве  $AUC_{\infty}$ . Для конъюгированного лекарственного средства все протестированные образцы имели сравнимые параметры РК  $C_{\max}$ , клиренс и экспозицию, выраженные в качестве  $AUC_{\infty}$ .

**Пример 43: Ответ роста опухоли на введение конъюгатов B7-H4\_2F9V18 и 1D11 с лекарственным средством-агонистом STING в модели на мышах с ксенотрансплантатом MX-1**

[920] Самкам мышей CB.17 SCID инокулировали подкожно фрагменты ксенотрансплантата рака молочной железы человека MX-1 (~1 мм<sup>3</sup> на мышь). Животных случайным образом распределяли на группы введения, когда объемы опухоли составляли 63-108 мм<sup>3</sup> (среднее значение=76,8-82 мм<sup>3</sup>/группа) (n=10/группа). Носитель, конъюгат 17 (0,085/0,030 или 2,84/0,100 мг/кг), конъюгат 16 (0,89/0,030 или 2,97/0,100 мг/кг), конъюгат 15 (0,85/0,030 или 2,83/0,100 мг/кг) или агонист STING diABZI IV (5 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза).

[921] На **фиг.11** приведены результаты для объемов опухолей у мышей, имевших опухоль MX-1, которым вводили конъюгаты с лекарственным средством-агонистом STING: конъюгат 17, конъюгат 16, конъюгат 15 и агонист STING diABZI IV. Введение конъюгата 17 (2,84/0,100 мг/кг) привело к 1 CR; это животное было классифицировано как свободное от опухоли выжившее животное на момент завершения испытания (сутки 60). Введение конъюгата 16 (0,89/0,030 мг/кг) привело к 1 PR и 2 CR; 1 TFS. Введение конъюгата 16 (2,97/0,100 мг/кг) привело к 8 CR, 6 TFS. Введение конъюгата 15 (0,85/0,030 мг/кг) привело к 1 CR и 1 TFS. Введение конъюгата 15 (2,83/0,100 мг/кг) привело к 10 CR, 5 TFS. Введение агониста STING diABZI IV (5 мг/кг) привело к 1 CR. Результаты показывают, что конъюгат 15 (2,83/0,100 мг/кг) был наиболее эффективным.

**Пример 44: Ответ роста опухоли на введение конъюгатов B7-H4\_2F9V18-цитотоксическое лекарственное средство в модели с ксенотрансплантатом MX-1 TNBC**

[922] Самкам мышей бестимусных мышей nude инокулировали подкожно фрагменты ксенотрансплантата рака молочной железы человека MX-1 (~1 мм<sup>3</sup> на мышь). Животных случайным образом распределяли на группы введения, когда объемы опухоли составляли 75-196 мм<sup>3</sup> (среднее значение=125-128 мм<sup>3</sup>/группу) (n=10/группу). Носитель, конъюгат 14 (2,57/0,150 мг/кг), конъюгат 9-2 (4,56/0,150 мг/кг), конъюгат 12 (2,26/0,150 или 1,13/0,075 мг/кг), конъюгат 1-3 (4,68/0,150 или 2,34/0,075 мг/кг) или конъюгат 2-2



(13,81/0,150 или 6,90/0,075 мг/кг) дозировали внутривенно на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Не отмечалось значительного снижения массы тела или изменения результатов клинических наблюдений.

[923] На **фиг.12** приведены результаты для объемов опухолей у мышей, имевших опухоль MX-1, которым вводили конъюгат **14**, конъюгат **9-2**, конъюгат **12**, конъюгат **1-3** или конъюгат **2-2**. Введение конъюгата **12** (2,26/0,150 мг/кг) привело к 1 CR. Введение конъюгата **1-3** (4,68/0,150 мг/кг) привело к 10 CR, 7 TFS. Введение конъюгата **1-3** (2,34/0,075 мг/кг) привело к 2 PR. Никакие другие введения не индуцировали ответ в виде регрессии.

**Пример 45: Экспозиция в плазме у мышей после введения конъюгатов В7-Н4\_2F9V18-цитотоксическое лекарственное средство**

[924] Самкам бестимусных мышей nude имплантировали подкожно фрагменты рака молочной железы человека MX-1 (~1 мм<sup>3</sup> на мышь). Носитель, конъюгат **1-3** (2,32/0,075; 4,65/0,15), конъюгат **2-2** (6,74/0,075; 13,5/0,15) или конъюгат **12** (1,13/0,075; 2,26/0,15) дозировали внутривенно в качестве однократной дозы на 1 сутки (все дозы приведены для антитела/груза). Образцы крови из надреза хвоста (0,04 мл) получали в следующие моменты времени: 15 минут, 24 часа (сутки 2), 72 часов (сутки 4), 168 часов (сутки 8), 240 часов (сутки 11) и 336 часов (сутки 15) после дозирования. Из крови получали плазму с антикоагулянтом K<sub>2</sub>EDTA, использованным для взятия. Образцы быстро замораживали и хранили при -80°C до транспортировки.

[925] Общее антитело определяли с использованием сэндвич-иммуноанализа MSD-ECL. Конъюгированное лекарственное средство определяли посредством LC-MS после проведения иммунного захвата образцов посредством антитела против Fc IgG1 человека, иммобилизованного на магнитных микроносителях, с последующим высвобождением AF-НРА посредством гидролиза. В таблицах 20 и 21 приведены параметры РК для общего антитела и конъюгированного лекарственного средства, соответственно.

**Таблица 20**

|                     | Доза<br>mAb/груз<br>(мг/кг) | C <sub>max</sub><br>(нг/мл) | t <sub>1/2</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub><br>(ч·нг/мл) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/ч/кг) | Vol <sub>ss</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Конъюгат <b>1-3</b> | 2,32/0,075                  | 37500                       | 89,8                 | 3650000                         | 0,637                          | 81,6                         |
| Конъюгат <b>1-3</b> | 4,65/0,15                   | 69600                       | 154                  | 10900000                        | 0,425                          | 93,1                         |
| Конъюгат <b>2-2</b> | 6,74/0,075                  | 106000                      | 175                  | 14900000                        | 0,452                          | 109                          |
| Конъюгат <b>2-2</b> | 13,5/0,15                   | 154000                      | 141                  | 21600000                        | 0,623                          | 128                          |
| Конъюгат <b>12</b>  | 1,13/0,075                  | 11400                       | 60,1                 | 704000                          | 1,61                           | 134                          |
| Конъюгат <b>12</b>  | 2,26/0,15                   | 25800                       | 65,8                 | 2250000                         | 1,00                           | 100                          |

**Таблица 21**

|  | Доза | C <sub>max</sub> | t <sub>1/2</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub> | Cl <sub>obs</sub> | Vol <sub>ss</sub> |
|--|------|------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|--|------|------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|

|              | mAb/груз<br>(мг/кг) | (нг/мл) |      | (ч·нг/мл) | (мл/ч/кг) | (мл/кг) |
|--------------|---------------------|---------|------|-----------|-----------|---------|
| Конъюгат 1-3 | 2,32/0,075          | 1430    | 93,6 | 142000    | 0,529     | 75,9    |
| Конъюгат 1-3 | 4,65/0,15           | 2630    | 73,6 | 309000    | 0,486     | 68,2    |
| Конъюгат 2-2 | 6,74/0,075          | 1360    | 150  | 143000    | 0,524     | 102     |
| Конъюгат 2-2 | 13,5/0,15           | 1920    | 109  | 199000    | 0,755     | 109     |
| Конъюгат 12  | 1,13/0,075          | 801     | 56,7 | 37900     | 1,98      | 163     |
| Конъюгат 12  | 2,26/0,15           | 1830    | 51,3 | 109000    | 1,38      | 108     |

[926] Для общего антитела, конъюгат 1-3, конъюгат 2-2 и конъюгат 12, по-видимому, имеют пропорциональную дозе  $C_{max}$ . Было выявлено, что конъюгат 12 имеет более низкую экспозицию и более быстрый клиренс по сравнению с конъюгатами 1-2 и 2-2. Конъюгат 1-3 имеет сравнимый клиренс с конъюгатом 2-2 при разных уровнях доз, но с низкой экспозицией (AUC) антитела.

[927] Для конъюгированного с антителом лекарственного средства, конъюгат 1-3, конъюгат 2-2 и конъюгат 12, по-видимому, имеют пропорциональную дозе  $C_{max}$ . Было выявлено, что конъюгат 12 имеет более низкую экспозицию и более быстрый клиренс по сравнению с конъюгатами 1-2 и 2-2. Конъюгат 1-3 имеет сравнимую экспозицию и клиренс с конъюгатом 2-1 при разных уровнях доз.

**Пример 46: Исследование экспозиции в плазме у яванских макаков после введения конъюгатов В7-Н4-цитотоксическое лекарственное средство**

[928] Яванским макакам инъецировали внутривенно носитель, конъюгат 1-3 (2,81/0,09) или конъюгат 2-2 (8,28/0,09) посредством в/в инфузии на протяжении 45 минут (один самец и одна самка для каждой группы). Взятие образцов крови проводили до введения дозы и через 1 час, 6 часов, 24 часов (сутки 1), 96 часов (сутки 5), 168 часов (сутки 8), 240 часов (сутки 11) и 336 часов (сутки 15) и 504 часа (сутки 22) после окончания инфузии. Из крови получали плазму с антикоагулянтом K2-EDTA, использованным для сбора. Образцы замораживали на сухом льду и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до транспортировки.

[929] Общее антитело определяли с использованием сэндвич-иммуноанализа MSD-ECL. Свободное лекарственное средство определяли посредством LC-MS. Конъюгированное лекарственное средство определяли посредством LC-MS после проведения иммунного захвата образцов посредством антитела против Fc IgG1 человека, иммобилизованного на магнитных гранулах, с последующим высвобождением AF-НРА посредством гидролиза. В таблицах 22, 23 и 24 приведены параметры РК для общего антитела, конъюгированного лекарственного средства и свободного лекарственного средства, соответственно.

**Таблица 22**

| Тестируемые образцы | Доза<br>mAb/груз | $C_{max}$<br>(нг/мл) | $t_{1/2}$ (ч) | $AUC_{inf}$<br>(ч·нг/мл) | $Cl_{obs}$<br>(мл/ч/кг) | $Vol_{ss}$<br>(мл/кг) |
|---------------------|------------------|----------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
|---------------------|------------------|----------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|

|              | (мг/кг)   |      |     |        |       |      |
|--------------|-----------|------|-----|--------|-------|------|
| Конъюгат 1-3 | 2,81/0,09 | 2570 | 112 | 312000 | 0,295 | 47,4 |
| Конъюгат 2-2 | 8,28/0,09 | 2600 | 126 | 305000 | 0,296 | 51,7 |

Таблица 23

| Тестируемые образцы | Доза<br>mAb/груз<br>(мг/кг) | C <sub>max</sub><br>(нг/мл) | t <sub>1/2</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub><br>(ч·нг/мл) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/ч/кг) | Vol <sub>ss</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Конъюгат 1-3        | 2,81/0,09                   | 69400                       | 161                  | 12300000                        | 0,243                          | 56,7                         |
| Конъюгат 2-2        | 8,28/0,09                   | 189000                      | 176                  | 34900000                        | 0,238                          | 65,3                         |

Таблица 24

| Тестируемые образцы | Доза<br>mAb/груз<br>(мг/кг) | C <sub>max</sub><br>(нг/мл) | t <sub>1/2</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub><br>(ч·нг/мл) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/ч/кг) | Vol <sub>ss</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Конъюгат 1-3        | 2,81/0,09                   | 0,508                       | 329                  | 187                             | N/A                            | N/A                          |
| Конъюгат 2-2        | 8,28/0,09                   | 1,05                        | N/A                  | N/A                             | N/A                            | N/A                          |

[930] Для общего антитела, конъюгат 1-3 имеет сравнимый клиренс с конъюгатом 2-2 при разных уровнях доз. Для конъюгированного лекарственного средства, конъюгат 1-3 имеет сравнимую экспозицию и клиренс с конъюгатом 2-2. Оба из конъюгата 1-3 и конъюгата 2-2 имеют низкие уровни свободного АФ-НРА.

**Пример 47: Исследование экспозиции в плазме яванского макака после введения конъюгатов В7-Н4-лекарственное средство-агонист STING**

[931] Яванским макакам инъектировали внутривенно конъюгат 15-2 (9,0/0,33) посредством в/в инфузии в течение 45 минут (один самец и одна самка). Взятие образцов крови проводили до введения дозы и через 1 час, 6 часов, 24 часа (сутки 1), 48 часов (сутки 2), 96 часов (сутки 5), 168 часов (сутки 8), 240 часов (сутки 11), 336 часов (сутки 15) и 504 часов (сутки 22) после окончания инфузии. Из крови получали плазму с антикоагулянтом K2-EDTA, использованным для сбора. Образцы замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до транспортировки.

[932] Общее антитело определяли с использованием сэндвич-иммуноанализа MSD-ECL. Свободное лекарственное средство определяли посредством LC-MS. Конъюгированное лекарственное средство определяли посредством LC-MS после проведения иммунного захвата образцов посредством антитела против Fc IgG1 человека, иммобилизованного на магнитных гранулах, с последующим высвобождением лекарственного средства посредством гидролиза. В таблицах 25, 26 и 27 приведены параметры РК для общего антитела, конъюгированного лекарственного средства и свободного лекарственного средства, соответственно.

Таблица 25

| Тестируемые образцы | Доза<br>mAb/груз<br>(мг/кг) | C <sub>max</sub><br>(нг/мл) | t <sub>½</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub><br>(ч·нг/мл) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/ч/кг) | Vol <sub>ss</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Конъюгат 15-2       | 9,0/0,33                    | 191000                      | 105                | 18200000                        | 0,494                          | 73,8                         |

Таблица 26

| Тестируемые образцы | Доза<br>mAb/груз<br>(мг/кг) | C <sub>max</sub><br>(нг/мл) | t <sub>½</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub><br>(ч·нг/мл) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/ч/кг) | Vol <sub>ss</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Конъюгат 15-2       | 9,0/0,33                    | 5540                        | 98,4               | 416000                          | 0,794                          | 107                          |

Таблица 27

| Тестируемые образцы | Доза<br>mAb/груз<br>(мг/кг) | C <sub>max</sub><br>(нг/мл) | t <sub>½</sub> (ч) | AUC <sub>inf</sub><br>(ч·нг/мл) | Cl <sub>obs</sub><br>(мл/ч/кг) | Vol <sub>ss</sub><br>(мл/кг) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Конъюгат 15-2       | 9,0/0,33                    | 40,1                        | 107                | 462                             | N/A                            | N/A                          |

**Пример 48. Эффективность конъюгата B7-H4\_2F9V18-цитотоксическое лекарственное средство в серии неотобранных ксенотрансплантатов первичного рака молочной железы человека**

[933] Панель из двадцати восьми моделей происходящих из пациентов ксенотрансплантатов рака молочной железы (Champions Oncology), аннотированная поставщиком по предшествующему анамнезу лечения и распределенная между TNBC и ER-положительными подтипами, имплантировали бестимусным мышам Nude-Foxn1n. Когда опухоли достигали среднего объема 150-300 мм<sup>3</sup>, животным (n=3) проводили однократное внутривенное введение конъюгата 1-3 ( 4,71 мг/кг/0,15 мг/кг, антитело/груз) или носителя в виде солевого раствора на сутки 1. Объемы опухолей измеряли до планируемого конечного результата в виде среднего объем опухоли в контрольной группе 1500 мм<sup>3</sup> или 28 сутки. В конечный момент времени ксенотрансплантаты или ложе опухоли (в случае отсутствия пальпируемой массы) собирали в качестве фиксированного в формалине залитого парафином материала. Две дополнительных ER-положительных модели, первоначально предложенные для этого испытания, были исключены из суммарного анализа вследствие неожиданно быстрого роста/неясного происхождения опухоли (CTG-3277) или очень медленного роста у животных, которым вводили носитель (CTG-2611).

[934] На **фиг.13** представлена эффективность конъюгата 1-3, упорядоченная по медианному наилучшему ответу (MBR) с разделением по статусу рецептора (TNBC- против ER-положительного), в соответствии с аннотацией поставщика. По оси Y представлен MBR, достигнутый каждой моделью, и по оси X идентифицирован ID модели. В этом испытании 9/28 (32%) моделей карциномы молочной железы достигли медианного наилучшего ответа 50% (показанного как -0,5 по оси Y) или лучше после однократной дозы

конъюгата 1-3, и противоопухолевый эффект MBR 50% или более был более частым в моделях TNBC 6/15 (40%) по сравнению с ER-положительными моделями 3/13 (23%).

**Пример 49. Экспрессия белка и РНК В7-Н4 в тканях первичного ксенотрансплантата у мышей**

[935] На основе доступности тканей ксенотрансплантатов из примера 44 проводили анализ РНК и белка. РНК экстрагировали из образцов FFPE с использованием набора Qiagen Rneasy FFPE в соответствии с инструкциями изготовителя. Образцы уравнивали на основе данных Nanodrop и продуцировали кДНК с использованием смеси Thermofisher SuperScript IV VILO Master Mix с ферментом exDNAse. Анализ экспрессии генов проводили с использованием TaqMan Fast Advanced Master Mix. Для VTCN1 использовали анализ ABI Hs01552471\_g1. В качестве эндогенных контролей использовали Hs99999903\_m1 ACTB и Hs03929097\_g1 GAPDH. Данные экспрессии анализировали в качестве  $\Delta\Delta$  Ct среднего значения для животных в каждой группе введения носителя (как правило, n=3) относительно универсального РНК-контроля.

[936] ИHC для детекции экспрессии В7-Н4 проводили на одном животном, которому вводили носитель, из каждой модели. В кратком изложении, ткани нарезали на срезы 4 мкм на положительно заряженных предметных стеклах и сушили в течение ночи. С использованием платформы Leica BOND III срезы сушили, депарафинизировали и подвергали демаскировке антигена (LEICA BOND III ER1+ протеаза К). Первичное антитело против В7-Н4 (Abcam ab209242) использовали в концентрации 0,2 мкг/мл (полученное в разбавителе DAKO/Agilent S3022). Детекцию сигнала проводили с использованием системы Leica BOND Polymer Refine /хромогена DAB. Предметные стекла исследовали посредством световой микроскопии и оценивали с использованием способов H-Score и TPS.

[937] На **фиг.14** представлена экспрессия белка при оценке по показателю TPS. Была выявлена взаимосвязь эффективность/экспрессия. Когда показатель TPS распределяли в соответствии со статусом рецептора, более высокая экспрессия была более вероятной в моделях, аннотированных как TNBC. Наблюдали сходный паттерн, сравнивающий оценку H или величины относительной экспрессии РНК с эффективностью соединения.

**ЭКВИВАЛЕНТЫ**

[938] Детали одного или нескольких вариантов осуществления описаны в прилагаемом описании выше. Хотя любые способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем описании, можно применять на практике или при тестировании настоящего изобретения, способы и материалы описаны в настоящем описании. Другие признаки, задачи и преимущества изобретения станут понятными из описания и формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа включает множественное число упоминаемых объектов, если контекст явно не указывает на иное. Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в области, к

которой относится настоящее изобретение. Все патенты и публикации, цитированные в настоящем описании, включены в качестве ссылок.

**[939]** Вышеуказанное описание предоставлено только для иллюстрации, и оно не предназначено для ограничения изобретения конкретной описанной формулой, а ограничивается формулой изобретения, прилагаемой к нему.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывает B7-H4, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

2. Выделенное антитело по п.1, где выделенное антитело содержит варибельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и варибельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

3. Выделенное антитело по п.1, где выделенное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

4. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело содержит варибельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и варибельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

5. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

6. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело.

7. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело кролика, мыши, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

8. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело представляет собой антитело IgG-изотипа.

9. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело представляет собой антитело IgG1-изотипа.

10. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное

антитело конкурирует за специфическое связывание B7-H4 человека с выделенным антителом, содержащим определяющую комплементарность область 1 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16), определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

11. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где выделенное антитело конкурирует за специфическое связывание B7-H4 человека с выделенным антителом, содержащим вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и вариабельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, или с выделенным антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

12. Конъюгат антитело против B7-H4-лекарственное средство, содержащий выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов

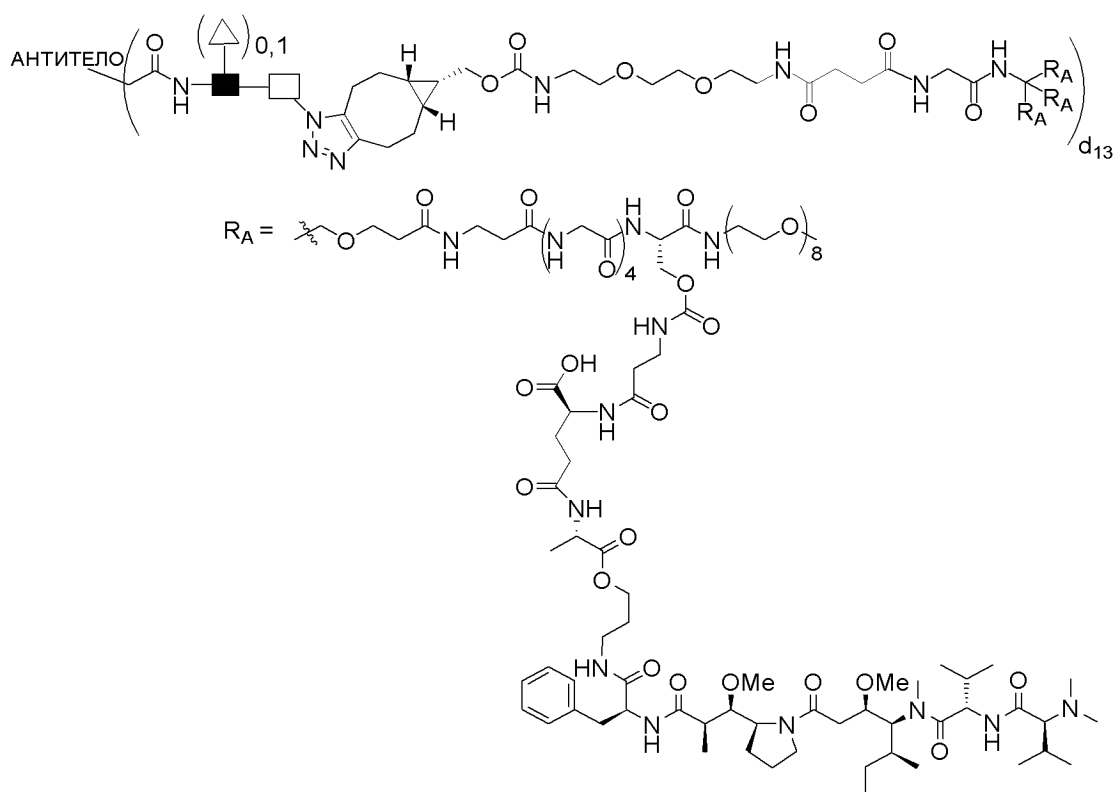
13. Конъюгат по п. 12, содержащий одну или несколько частей линкер-лекарственное средство, ковалентно связанных с нацеливающей частью, где каждая часть линкер-лекарственное средство содержит многофункциональный линкер, который соединяет нацеливающую часть с одним или несколькими лекарственными элементами (например, одно или несколько терапевтических средств (D)) через посредничество высвобождаемого сборочного элемента для каждого лекарственного элемента, и соединяет гидрофильную группу с лекарственными элементами каждой части линкер-лекарственное средство; высвобождаемый сборочный элемент способен высвободить свободное лекарственное средство вблизи целевой области, на которую нацелена нацеливающая часть; и многофункциональный линкер содержит пептидную часть между нацеливающей частью и гидрофильной группой, где пептидная часть содержит по меньшей мере две аминокислоты.

14. Конъюгат, выбранный из любого из конъюгатов, приведенных в таблице A1 и таблице A2.

15. Конъюгат, выбранный из любого из конъюгатов, приведенных в таблице B1 и таблице B2.

16. Конъюгат по п. 12, имеющий формулу (XXXVII):





(XXXVII)

где

$d_{13}$  равен 2;

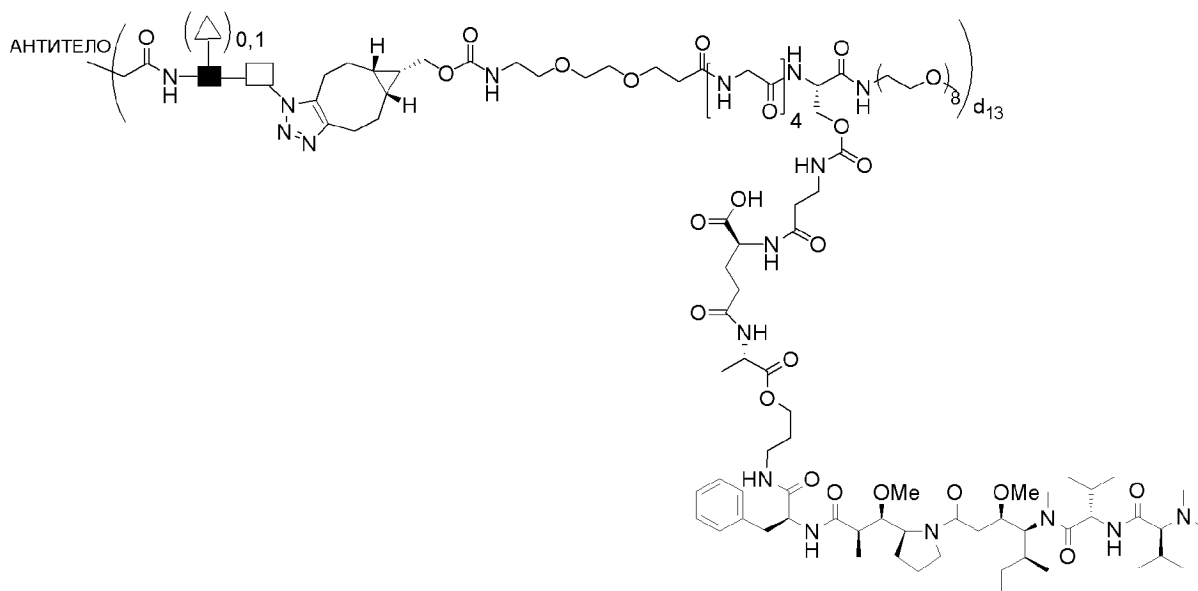
АНТИТЕЛО представляет собой антитело против B7-H4, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGM DV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55),

часть линкер-лекарственное средство присоединена к группе аспарагина на N297 антитела против B7-H4;

■ представляет собой GlcNAc;

△ представляет собой Fuc и □ представляет собой GalNAc.

17. Конъюгат по п.12, имеющий формулу (XXXVIII):



(XXXVIII)

где

$d_{13}$  представляет собой целое число 2;

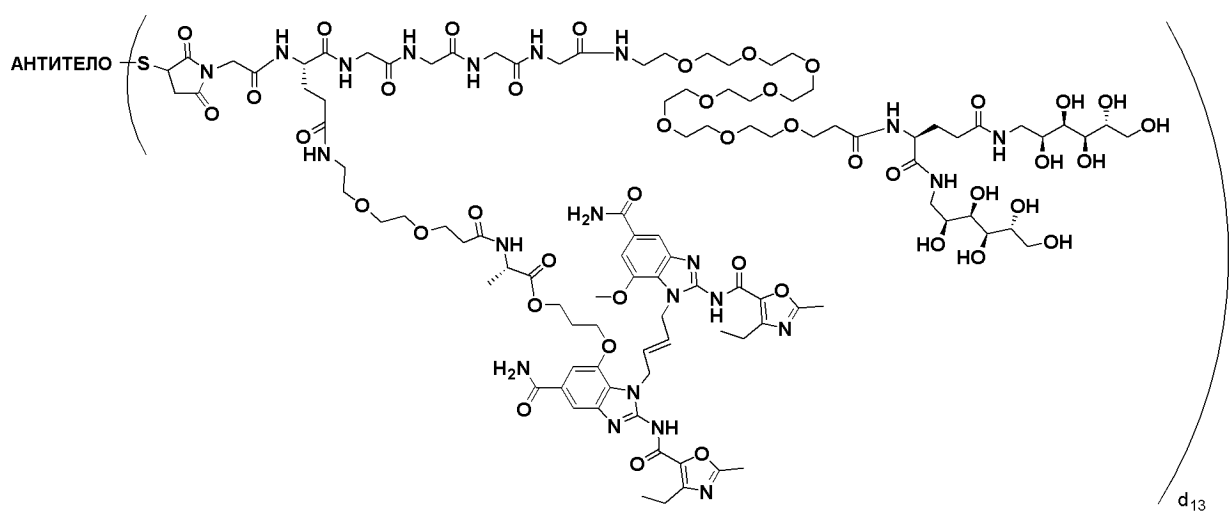
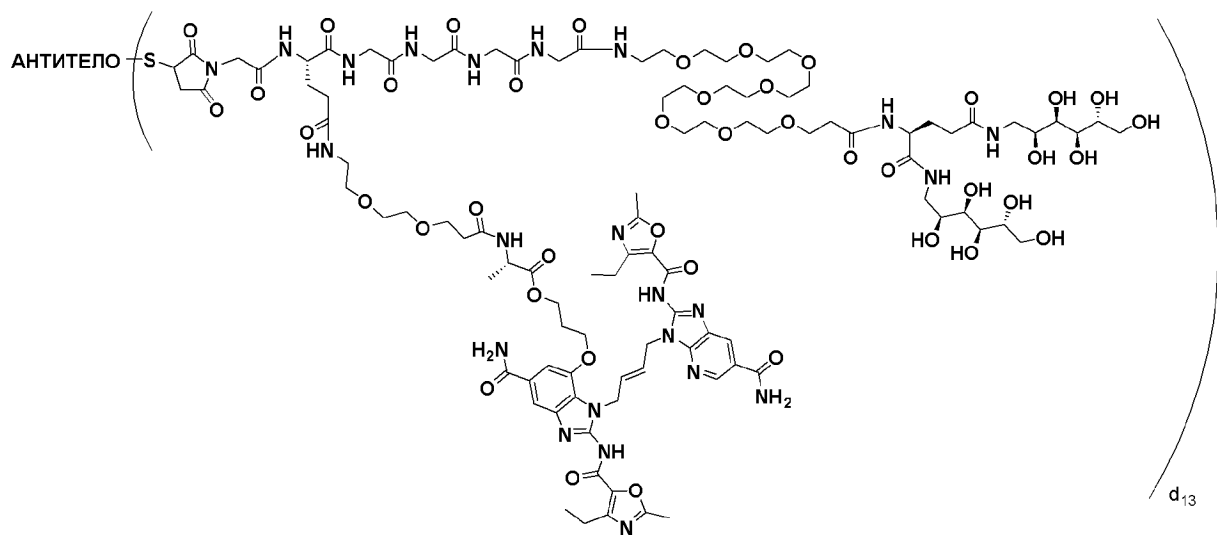
АНТИТЕЛО представляет собой антитело против B7-H4, содержащее: определяющую комплементарность область 1 переменной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность область 2 переменной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 переменной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 переменной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 переменной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 переменной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55),

часть линкер-лекарственное средство присоединена к группе аспарагина на N297 антитела;

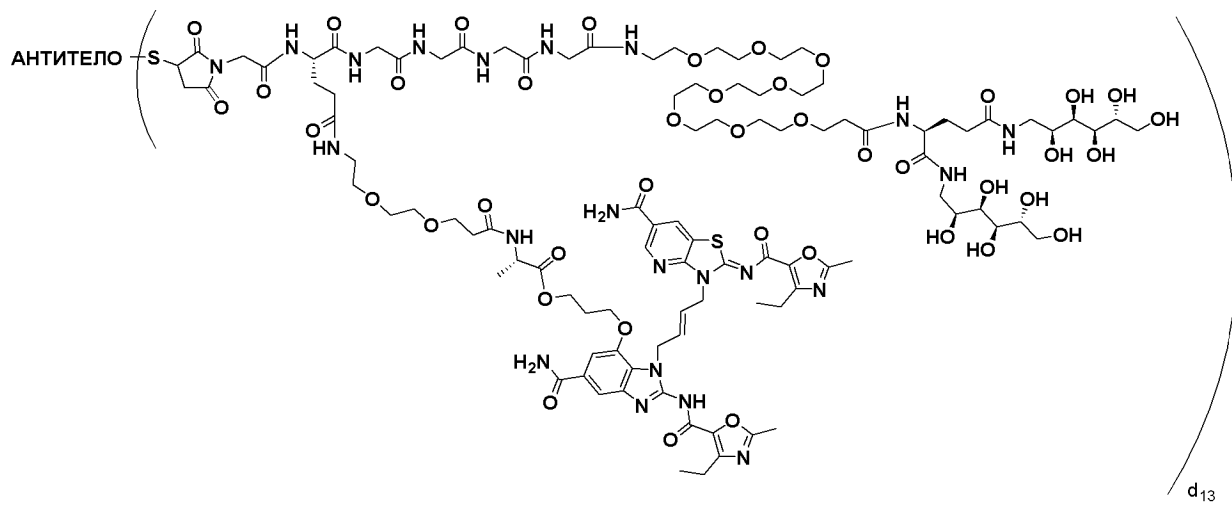
■ представляет собой GlcNAc;

△ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

18. Конъюгат формулы:



ИЛИ



где d<sub>13</sub> представляет собой 8, АНТИТЕЛО представляет собой антитело против В7-Н4 или антитело с встроенным цистеином против В7-Н4,

где антитело против В7-Н4 содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GFIVSRNY (SEQ ID NO: 2), определяющую комплементарность

область 2 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность IYGSGRT (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность ARDADYGLDV (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность ARDADYGMDV (SEQ ID NO: 10), определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность QSVSSSY (SEQ ID NO: 53), определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность GAS (SEQ ID NO: 54), определяющую комплементарность область 3 вариабельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYGSSPLYT (SEQ ID NO: 55).

19. Способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму конъюгата по любому из пп.12-18.

20. Конъюгат по любому из пп.12-18 для применения для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

21. Применение конъюгата по любому из пп.12-18 для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

22. Применение конъюгата по любому из пп. 12-18 для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

23. Способ, конъюгат или применение по любому из пп. 19-22, где указанный конъюгат высвобождает одно или несколько терапевтических средств при биодеградаци.

24. Способ, конъюгат или применение по любому из пп. 19-23, где заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль.

25. Способ, конъюгат или применение по п.24, где злокачественная опухоль представляет собой B7-H4-положительную злокачественную опухоль.

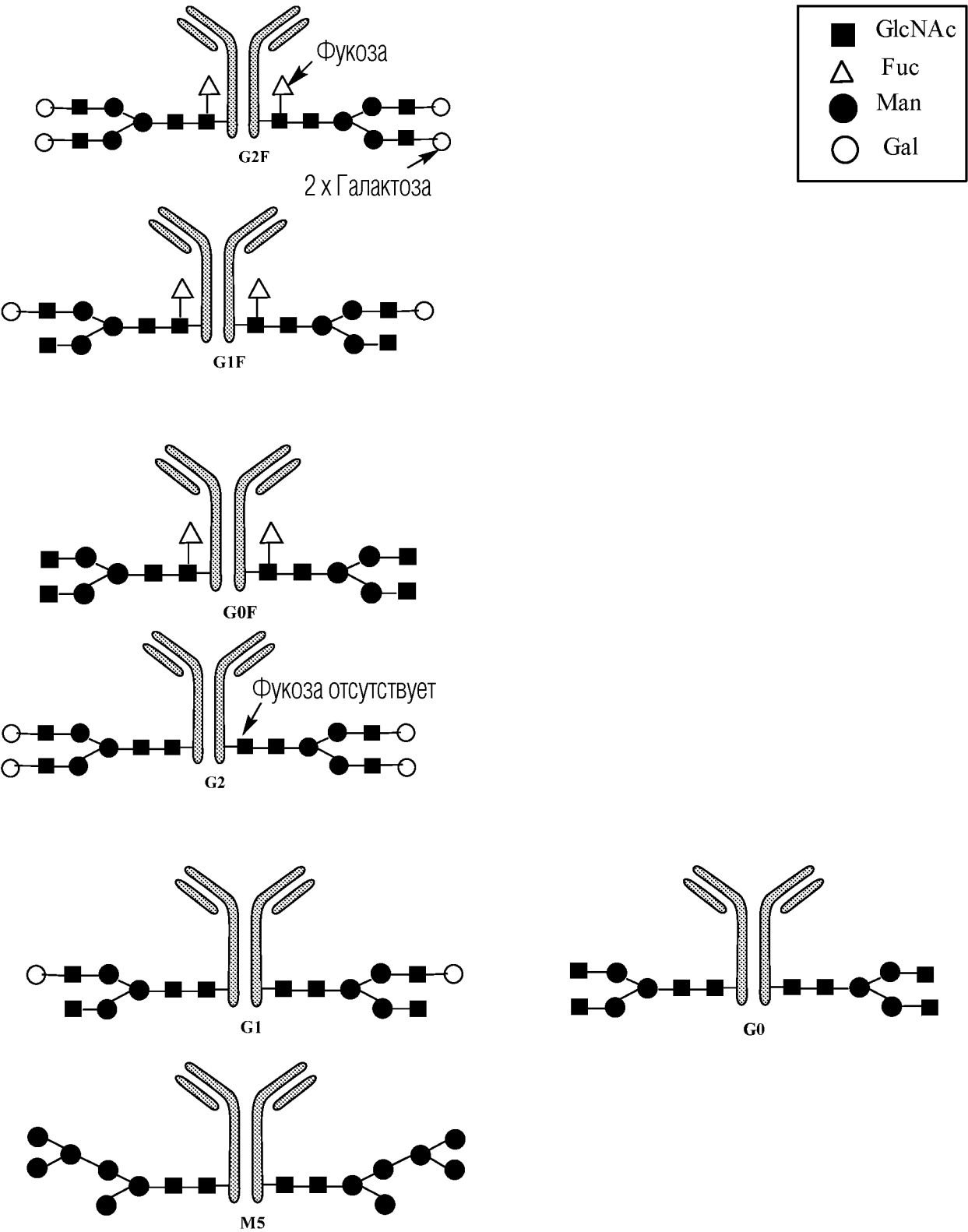
26. Способ, конъюгат или применение по п.25, где B7-H4-положительная злокачественная опухоль представляет собой карциному желчных протоков, рак молочной железы, рак эндометрия, рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак тела матки, рак щитовидной железы, рак почки, рак головы и шеи, рак желудка, меланому, карциному желчных протоков, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак толстого кишечника или рак мочевого пузыря.

27. Способ, конъюгат или применение по любому из пп. 19-26, где индивидуумом является человек.

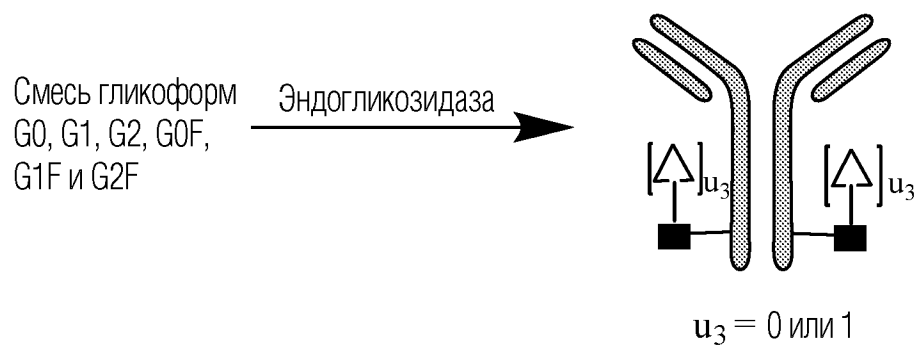
28. Способ по любому из пп. 19-27, дополнительно включающий введение индивидууму терапевтического средства.

По доверенности

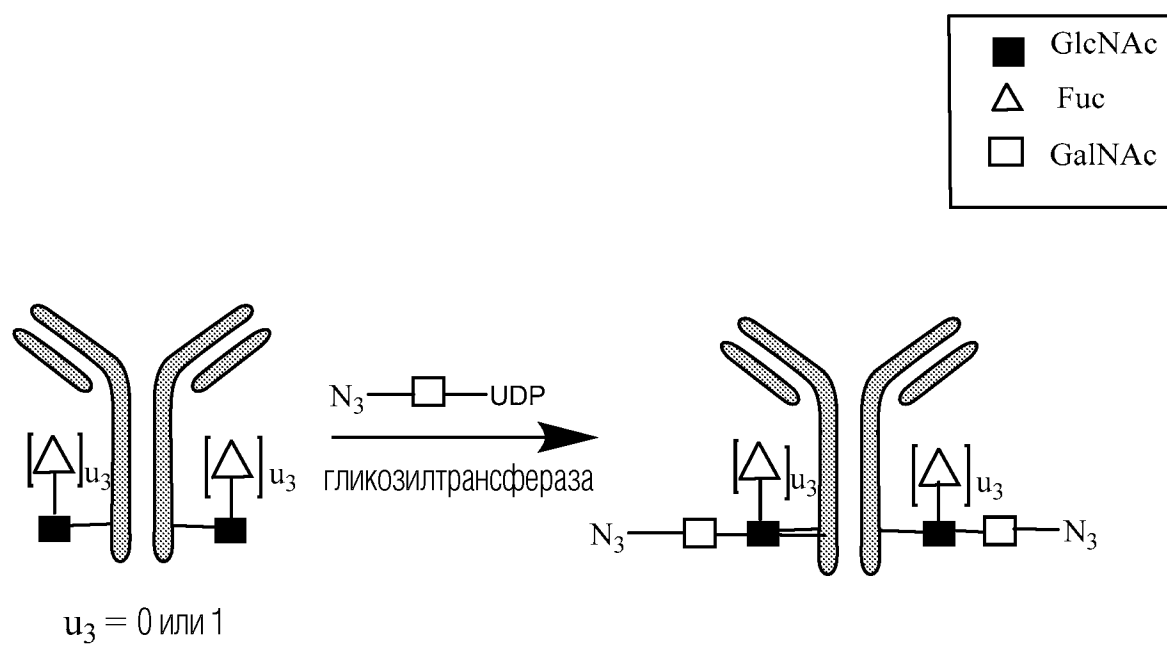
ФИГ. 1



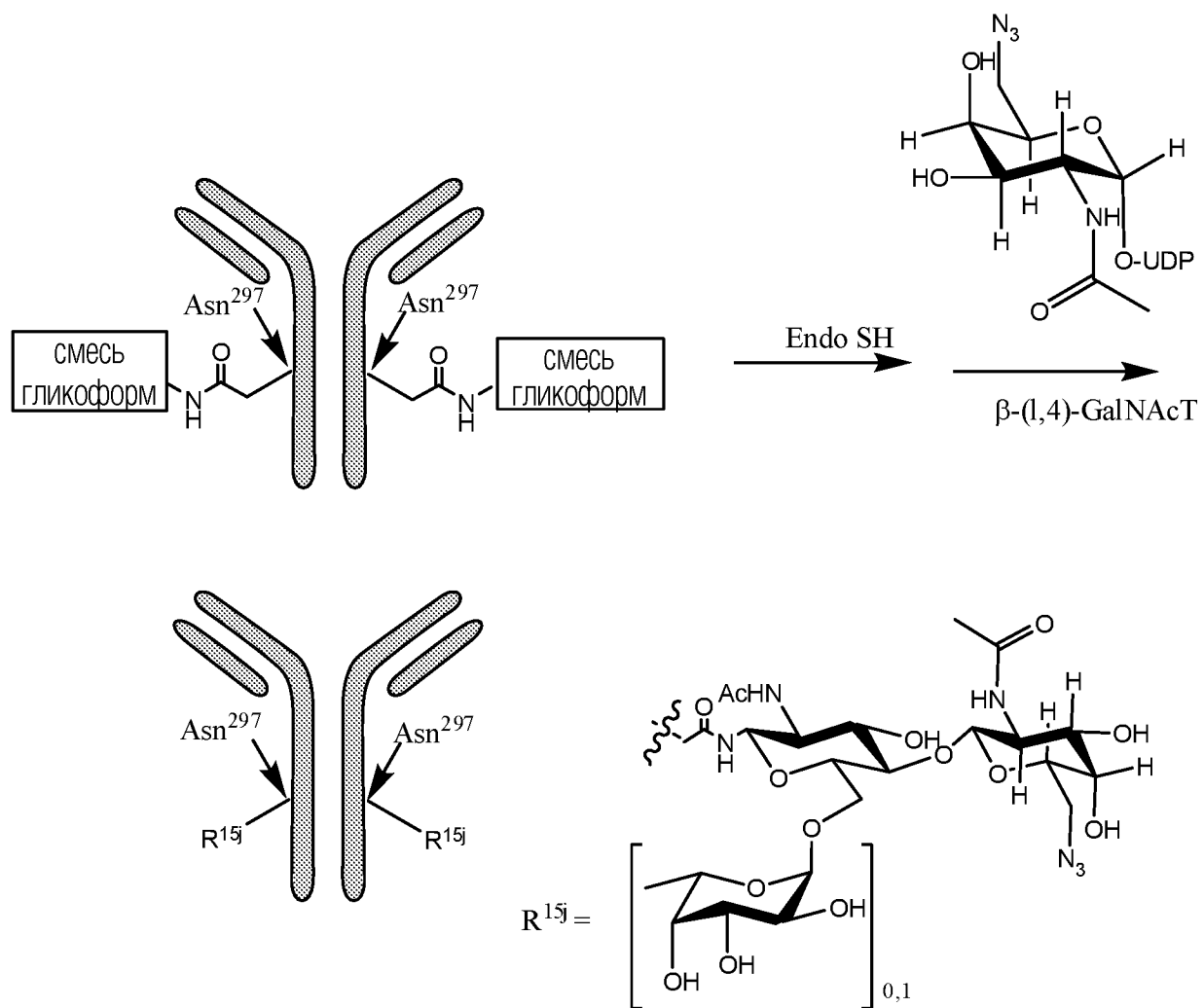
## ФИГ. 2



## ФИГ. 3

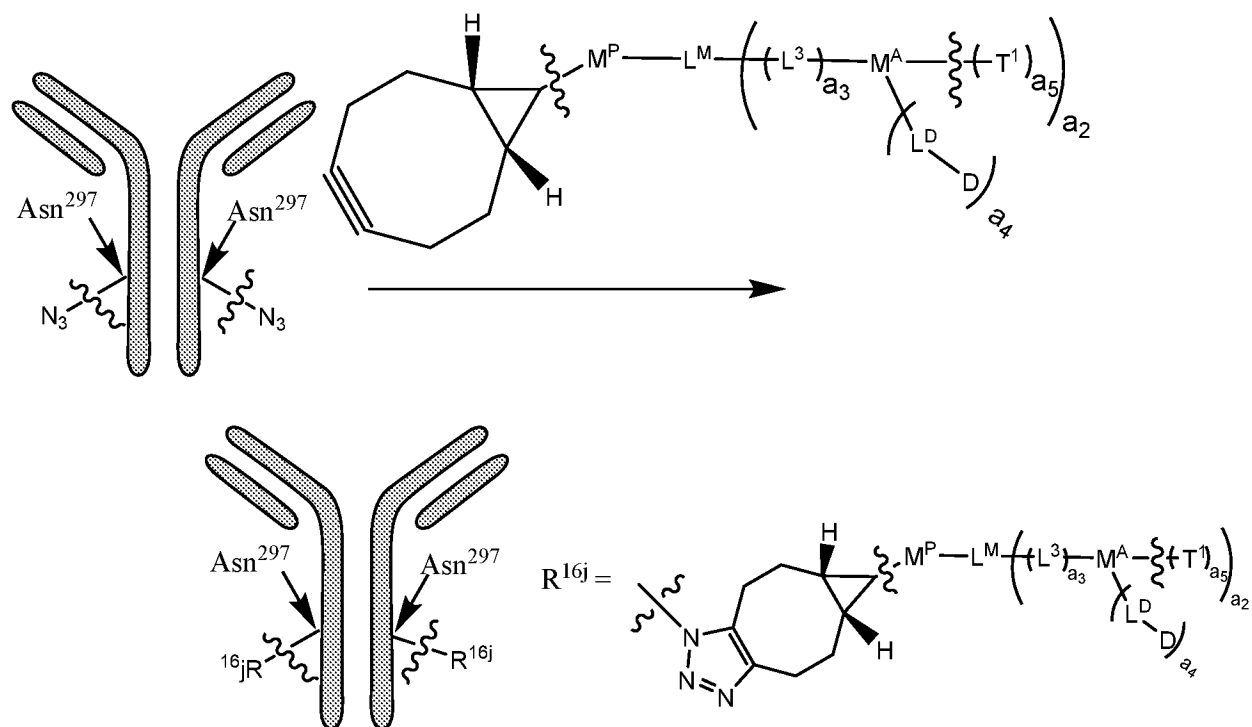


ФИГ. 4

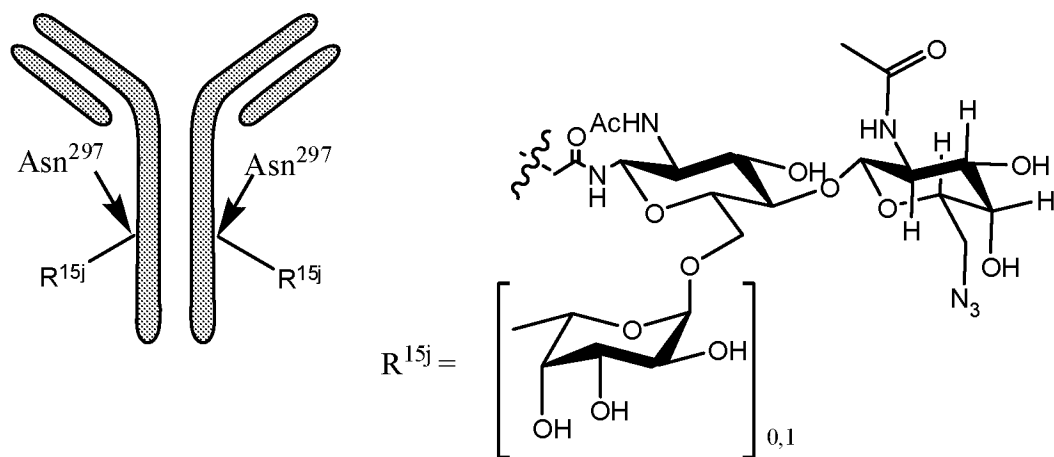




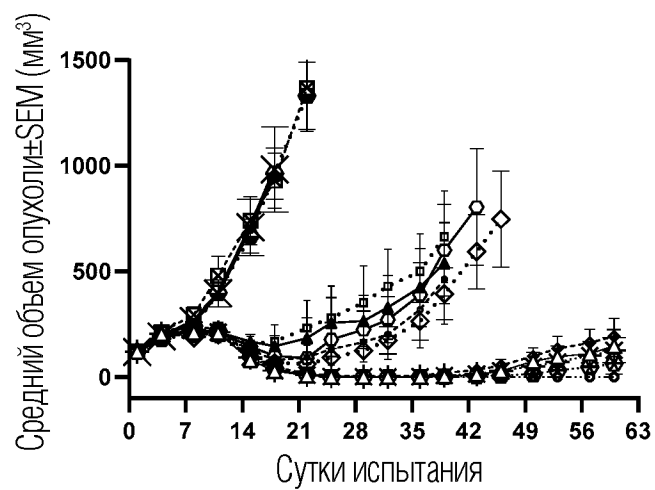
## ФИГ. 5



## ФИГ. 6

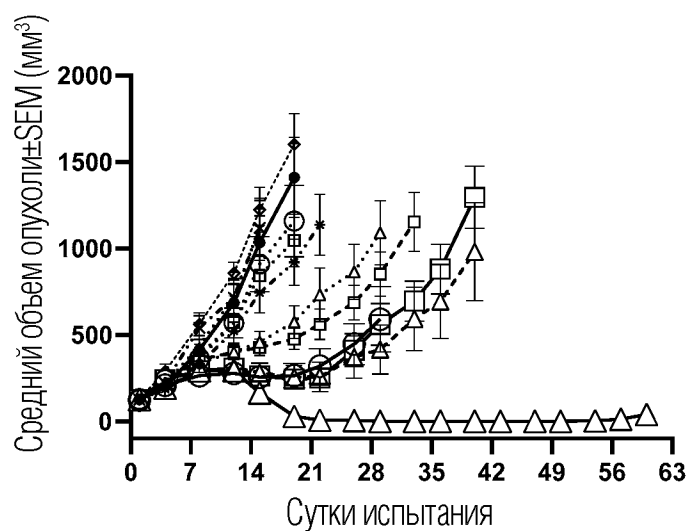


ФИГ. 7



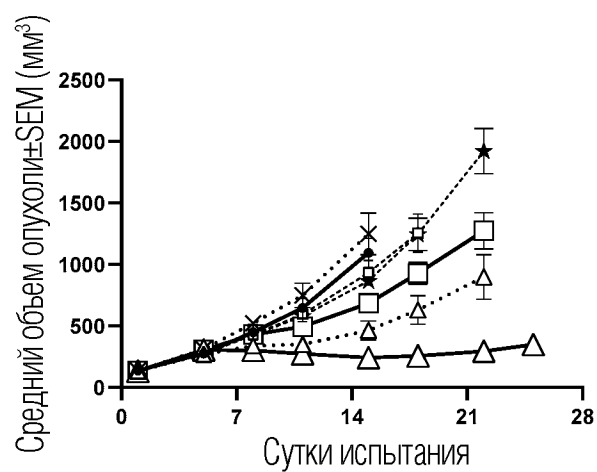
- |                                        |                                          |
|----------------------------------------|------------------------------------------|
| —X— Носитель                           | -----◇----- Конъюгат 6, 2.30/0.075 мг/кг |
| ...●... Конъюгат 9-1, 2.46/0.075 мг/кг | ...●... Конъюгат 6, 4.61/0.150 мг/кг     |
| ---■--- Конъюгат 9-1, 4.92/0.150 мг/кг | —○— Конъюгат 7, 2.30/0.075 мг/кг         |
| ...◇... Конъюгат 11, 2.28/0.075 мг/кг  | ...●... Конъюгат 7, 4.60/0.150 мг/кг     |
| ---◆--- Конъюгат 11, 4.56/0.150 мг/кг  | —▲— Конъюгат 1-1, 2.30/0.075 мг/кг       |
| ...■... Конъюгат 3, 2.30/0.075 мг/кг   | —△— Конъюгат 1-1, 4.60/0.150 мг/кг       |
| ...*... Конъюгат 3, 4.60/0.150 мг/кг   |                                          |

ФИГ. 8



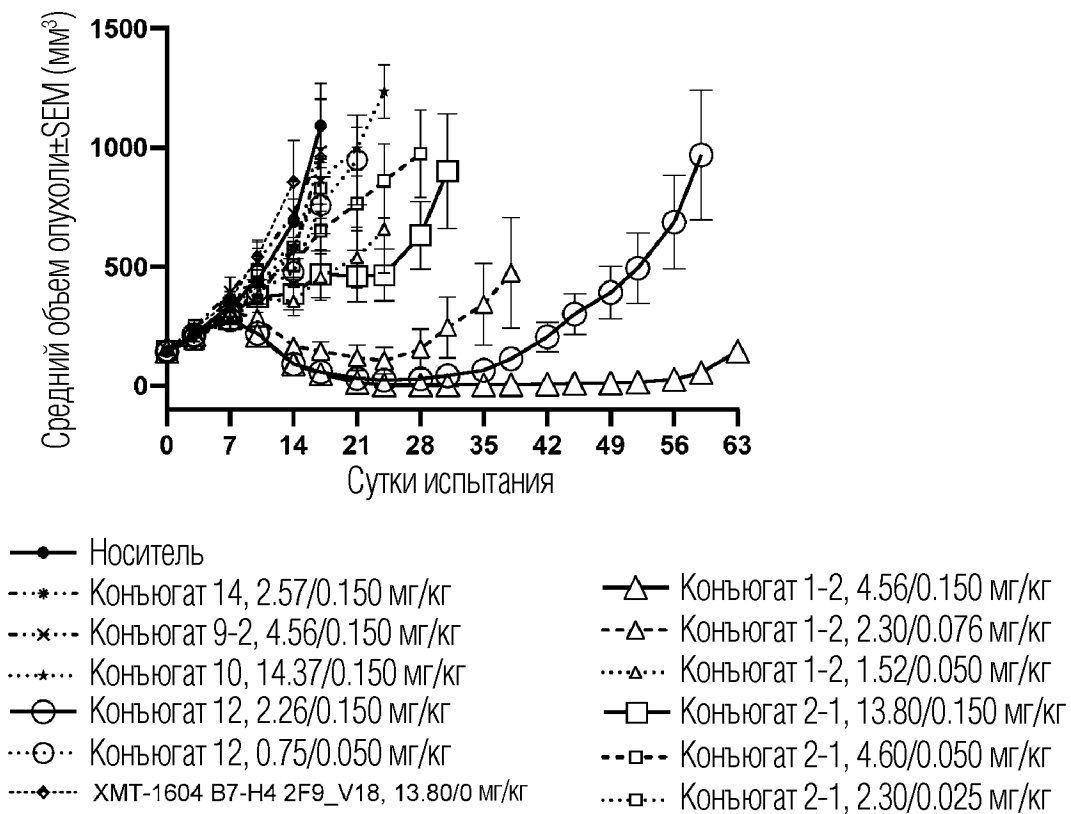
- |                                              |                                        |
|----------------------------------------------|----------------------------------------|
| —●— Носитель                                 | —△— Конъюгат 1-2, 5.37/0.177 мг/кг     |
| ---*--- Конъюгат 14, 2.57/0.150 мг/кг        | --△-- Конъюгат 1-2, 2.33/0.077 мг/кг   |
| ---x--- Конъюгат 9, 4.56/0.150 мг/кг         | ...△... Конъюгат 1-2, 1.79/0.059 мг/кг |
| ...★... Конъюгат 10, 14.37/0.150 мг/кг       | —□— Конъюгат 2-1, 13.45/0.150 мг/кг    |
| —○— Конъюгат 12, 2.26/0.150 мг/кг            | --□-- Конъюгат 2-1, 4.60/0.050 мг/кг   |
| ...⊙... Конъюгат 12, 0.75/0.050 мг/кг        | ...□... Конъюгат 2-1, 2.30/0.025 мг/кг |
| ---◆--- ХМТ-1604 В7-Н4 2F9_V18, 13.8/0 мг/кг |                                        |

ФИГ. 9

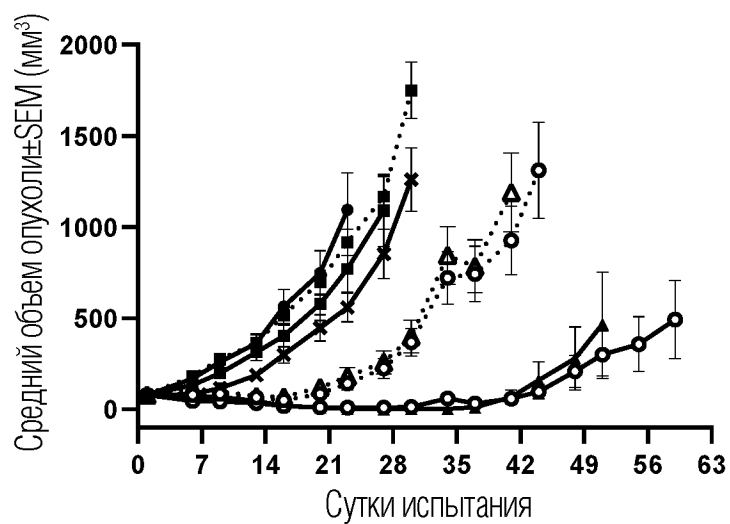


- Носитель
- △· Конъюгат 1-2, 1.79/0.059 мг/кг
- △ Конъюгат 1-2, 5.37/0.177 мг/кг
- ×· Конъюгат 9-2, 4.56/0.150 мг/кг
- Конъюгат 2-1, 4.60/0.050 мг/кг
- Конъюгат 2-1, 13.45/0.150 мг/кг
- ★· Конъюгат 10, 14.37/0.150 мг/кг

ФИГ. 10

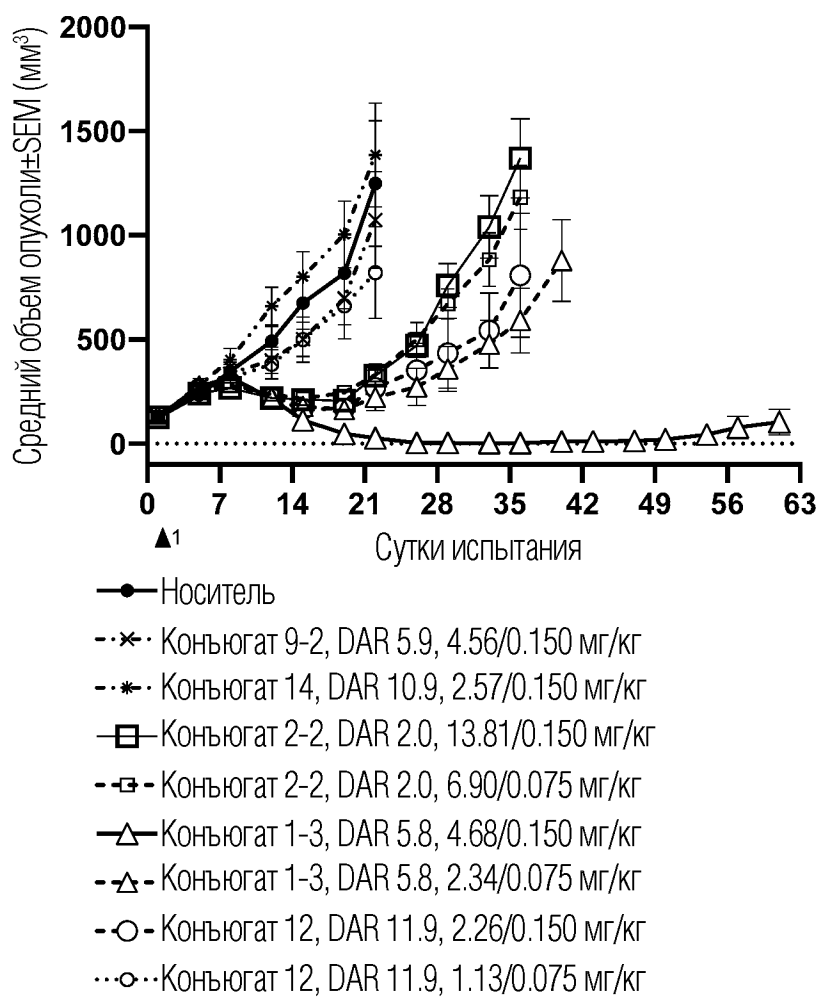


## ФИГ. 11



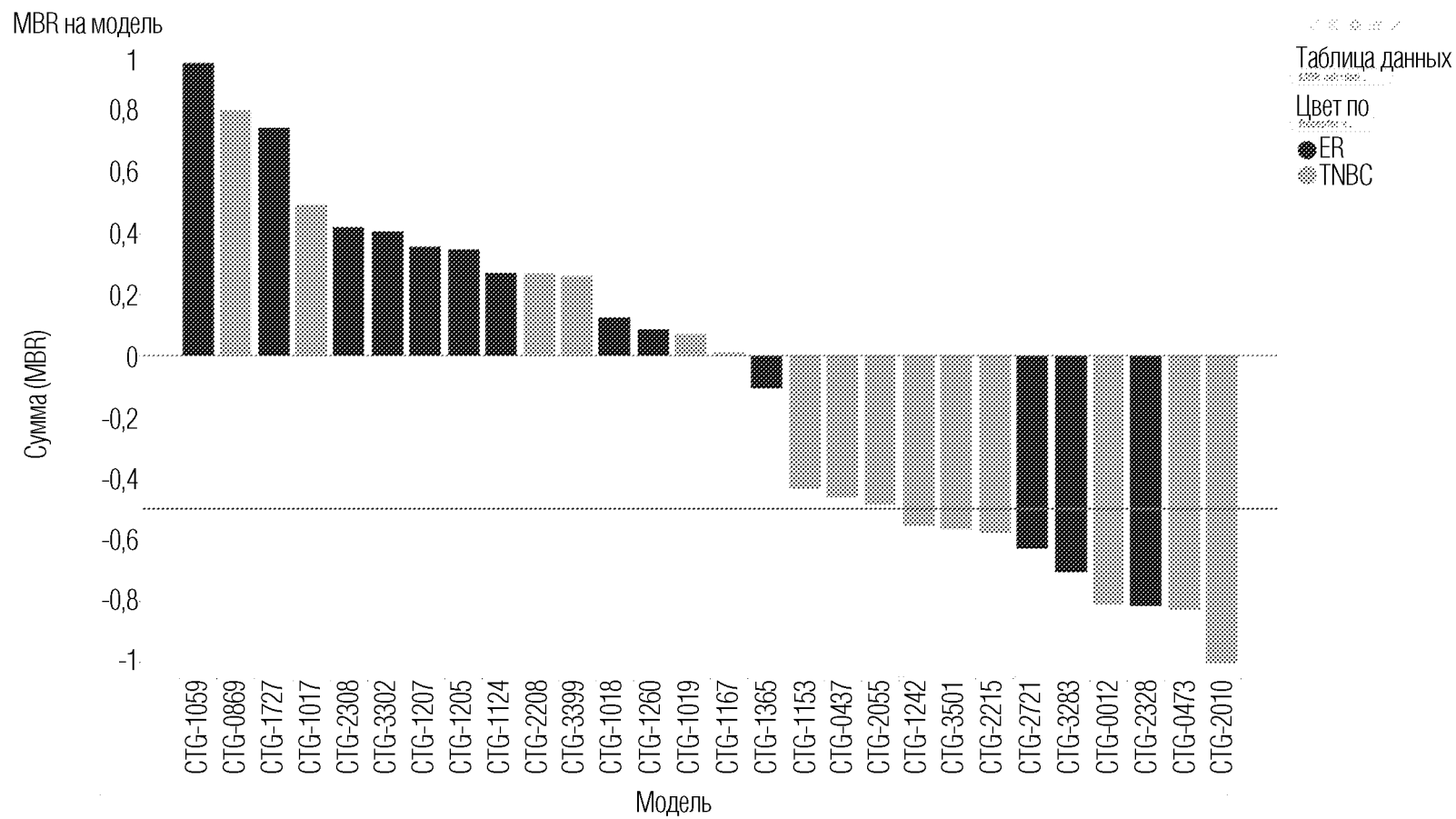
- Носитель
- Конъюгат 17, 0.85/0.030 мг/кг
- Конъюгат 17, 2.84/0.100 мг/кг
- Конъюгат 16, 0.89/0.030 мг/кг
- Конъюгат 16, 2.97/0.100 мг/кг
- △·· Конъюгат 15, 0.85/0.030 мг/кг
- △— Конъюгат 15, 2.83/0.100 мг/кг
- ×— Агонист STING diABZI IV, 5 мг/кг

ФИГ. 12





ФИГ. 13



МВР на модель

Сумма (МВР)

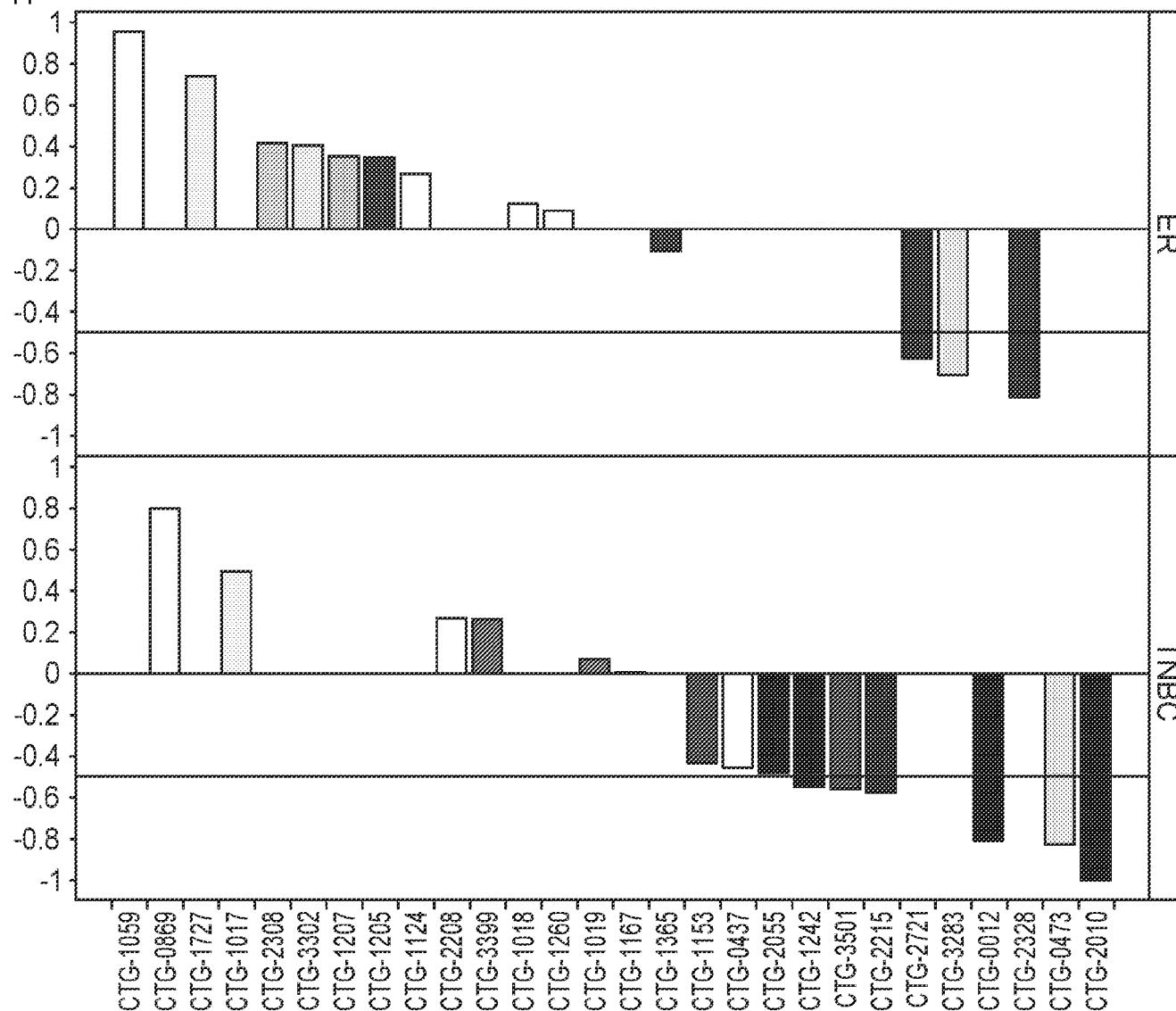


Таблица данных:

МВР calculations\_11\_11 - summary

Сетка согласно:

Обобщение рецепторов

Цвет по:

TPS

Max (100.00)

Min (0.00)

ER

TNBC

Модель

ФИГ. 14