(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201792055 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.01.31

(22) Дата подачи заявки
2016.03.17

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD48 И ИХ КОНЪЮГАТЫ

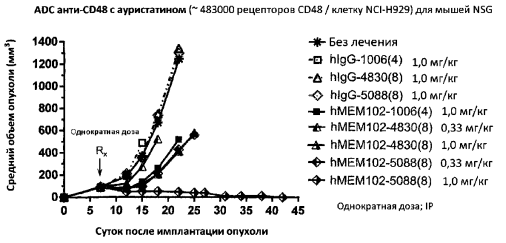
(31) **62/134,981**
(32) **2015.03.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2016/022943**
(87) **WO 2016/149535 2016.09.22**

(71) Заявитель:
СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Льюис Тимоти, Гордон Кристин, Вестендорф Лори (US)

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

(57) В данном изобретении представлены мышиные, химерные и гуманизированные антитела, которые специфически связываются с CD48, и их конъюгаты.



201792055 A1

201792055 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-544623EA/071

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD48 И ИХ КОНЪЮГАТЫ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет согласно статье 119(e) раздела 35 Кодекса законов США по предварительной заявке на патент США № 62/134981, поданной 18 марта 2015 г., которая включена в данный документ путем ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] В данном изобретении представлены мышиные, химерные и гуманизированные антитела, которые специфически связываются с CD48, и их конъюгаты.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

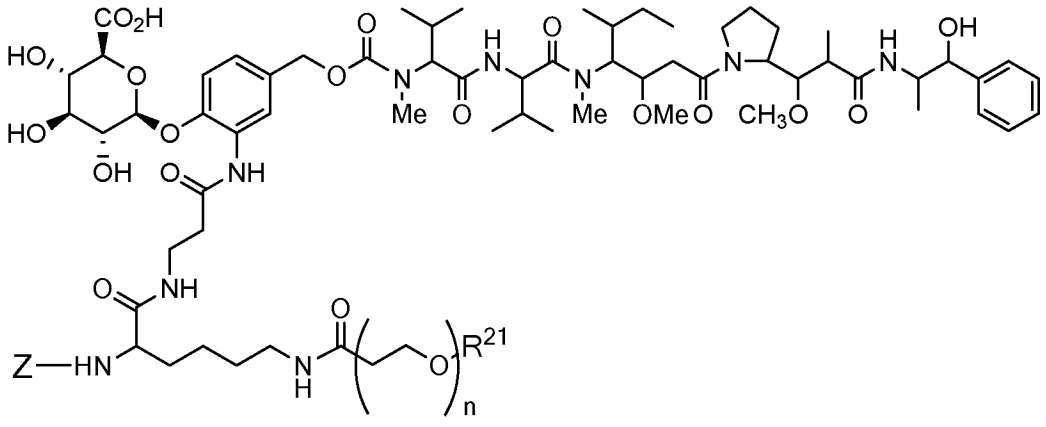
[0003] Антиген CD48 (кластер дифференцировки 48) также известен как маркер активации B-лимфоцитов (БЛАСТНАЯ КЛЕТКА-1) или молекула 2 передачи сигнала лимфоцитарной активации (SLAMF2). CD48 является представителем подсемейства CD2 суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), которое включает белки SLAM (молекулы передачи сигнала активации лимфоцитов), такие как CD84, CD150, CD229 и CD244. CD48 обнаружен на поверхности лимфоцитов и других иммунных клеток, а также дендритных клеток, и он принимает участие в механизмах активации и дифференцировке в этих клетках. Известно, что CD48 экспрессируется на клетках множественной миеломы и других раковых новообразований B-клеточного происхождения, например, неходжкинской лимфомы (NHL), хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL), моноклональной гаммапатии неясного генеза (MGUS), макроглобулинемии Вальденстрема (WM), опухолевых клетках больного первичным/системным амилоидозом и клетках фолликулярной лимфомы (FL).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В одном аспекте данного описания предложено химерное или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком CD48 человека. Данное антитело включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:3-5 и

последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:6-8. Данное антитело проявляет более высокую аффинность связывания с белком CD48 человека по сравнению с мышиным антителом, которое специфически связывается с белком CD48 человека и также включает последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:6-8. В одном варианте реализации изобретения химерное или гуманизированное антитело проявляет по меньшей мере в 2 раза более высокую аффинность связывания для белка CD48 человека по сравнению с мышиным антителом. В другом варианте реализации изобретения антитело представляет собой гуманизированное антитело. В дополнительном варианте реализации изобретения антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO:1. В другом варианте реализации изобретения антитело содержит вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO:2. В дополнительном варианте реализации изобретения антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO:1 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO:2. В одном варианте реализации изобретения антитело конъюгировано с цитотоксическим лекарственным средством, присоединенным к линкеру.

[0005] В дополнительном варианте реализации изобретения присоединенное к антителу лекарственное средство-линкер имеет формулу:

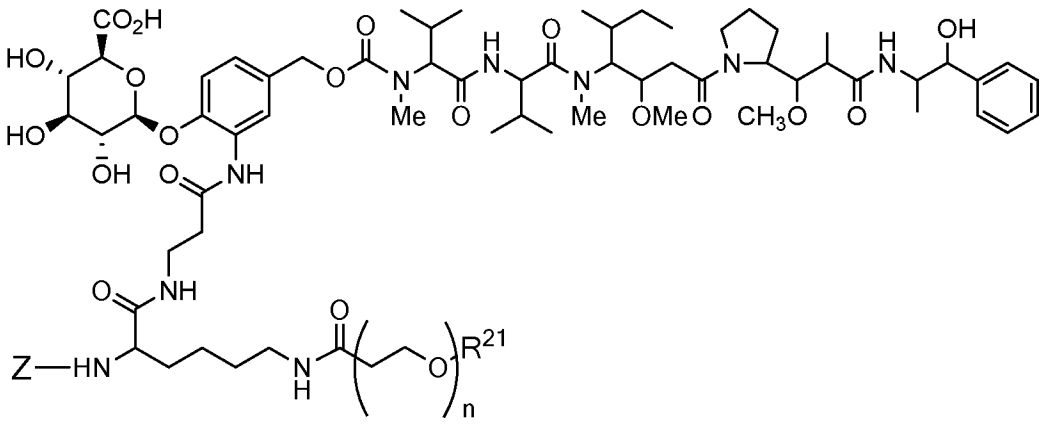


или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, для образования с ней

ковалентного соединения, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

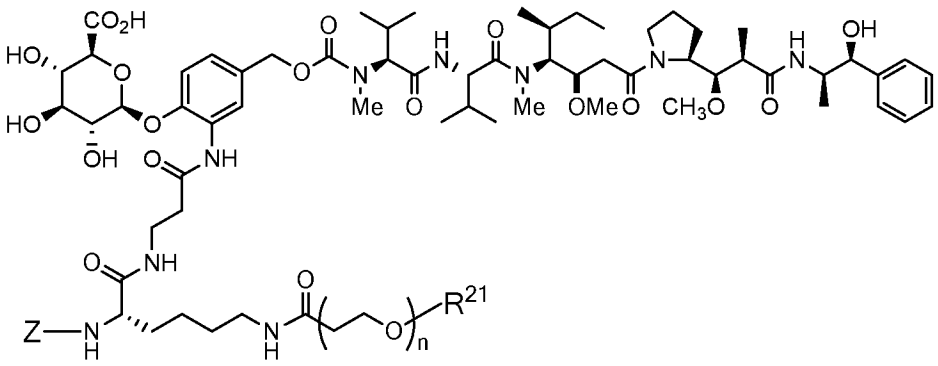
[0006] В другом аспекте данного описания предложено гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком CD48 человека, которое содержит вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO:1 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO:2.

[0007] Данное антитело, в одном варианте реализации изобретения, конъюгировано с цитотоксическим лекарственным средством, присоединенным к линкеру. Типовое лекарственное средство-линкер имеет формулу:



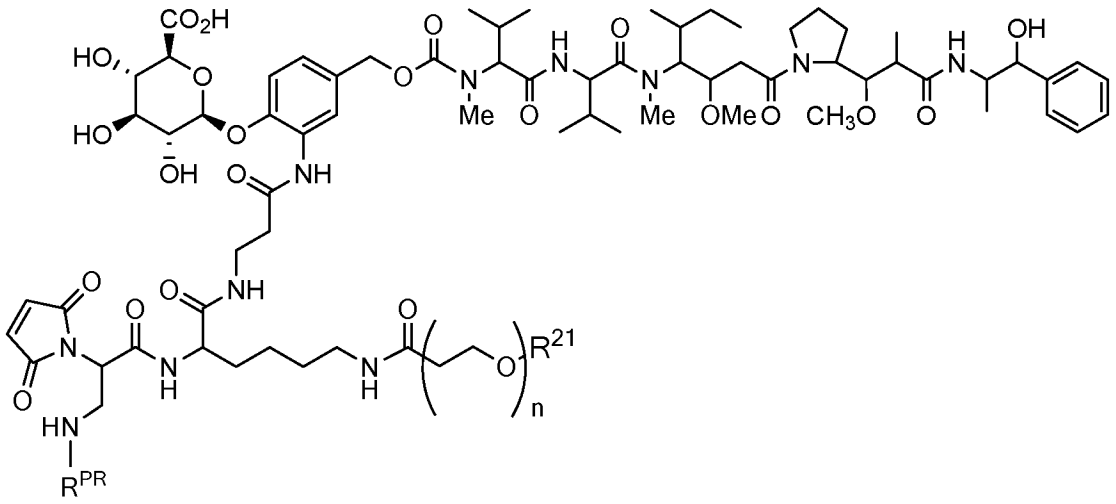
или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, для образования с ней ковалентного соединения, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

[0008] Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



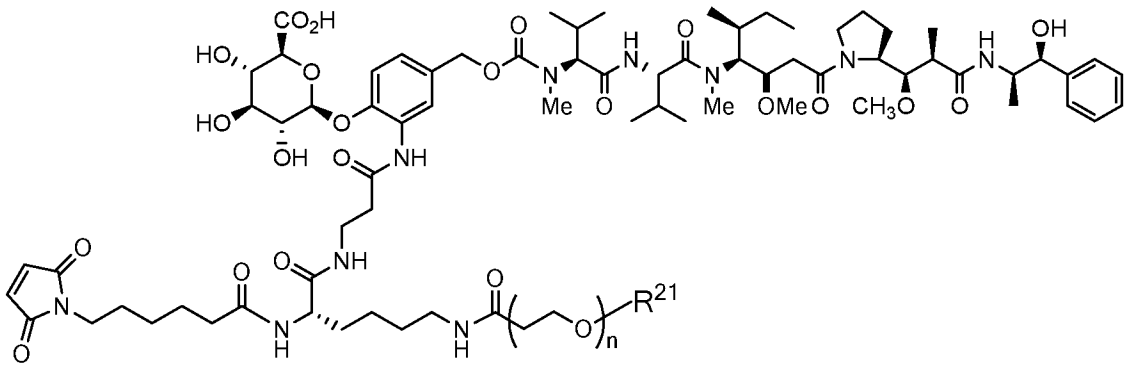
или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, для образования с ней ковалентного соединения, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

[0009] Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

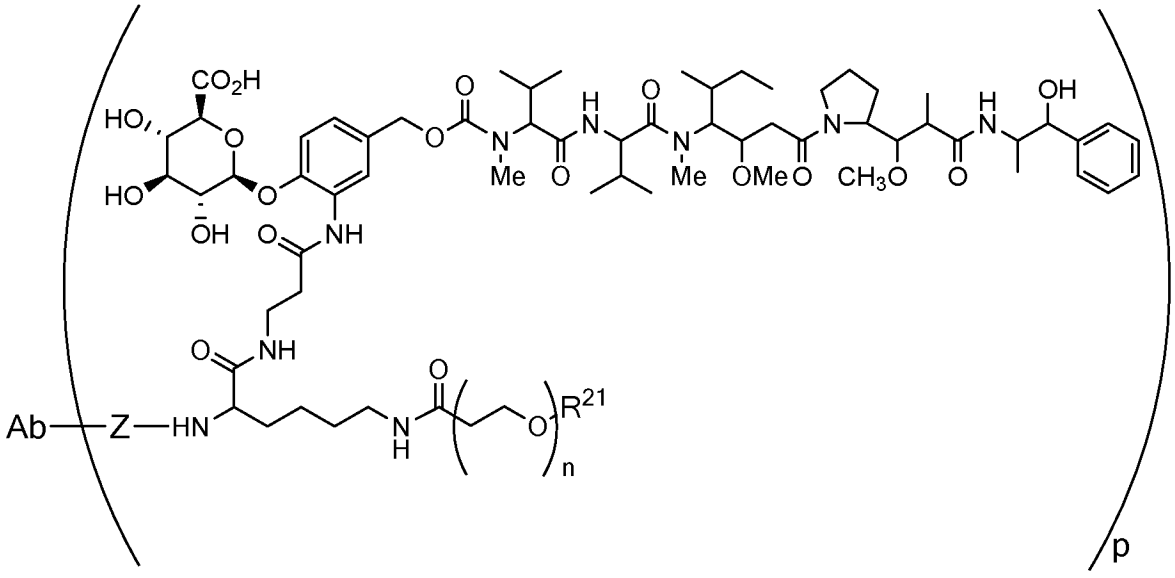
Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

В некоторых вариантах данного описания значение n может находиться в диапазоне от 8 до 14. В других вариантах данного описания значение n находиться в диапазоне от 10 до 12. В дополнительном варианте реализации данного описания значение n составляет 12. В другом варианте реализации изобретения R^{21} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

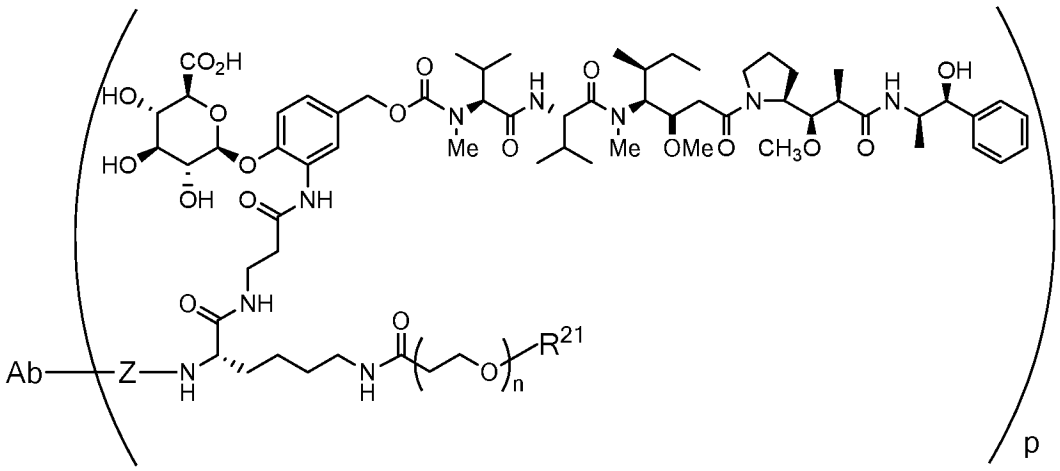
[0010] В другом аспекте данного описания предложено соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства, имеющего формулу



или ее фармацевтически приемлемая соль, где Z представляет собой органический фрагмент, связывающий антитело и остаток лекарственного средства-линкера посредством ковалентных связей, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля, а p составляет

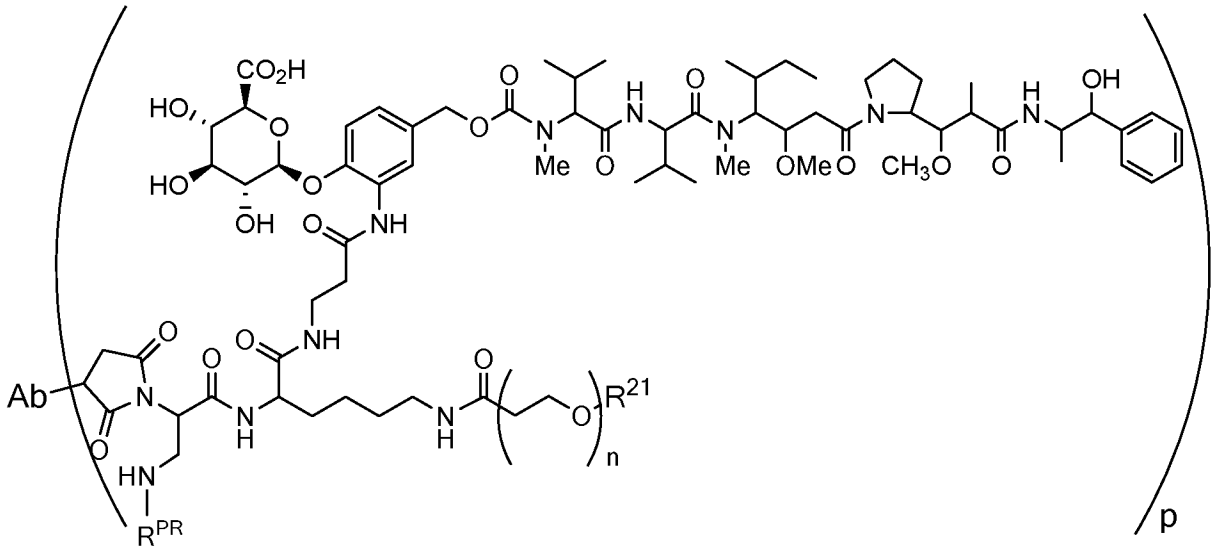
от 1 до 16. Антитело может быть любым из описанных анти-CD48 антител. В предпочтительной варианте реализации изобретения антитело имеет вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO:1 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO:2.

[0011] Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



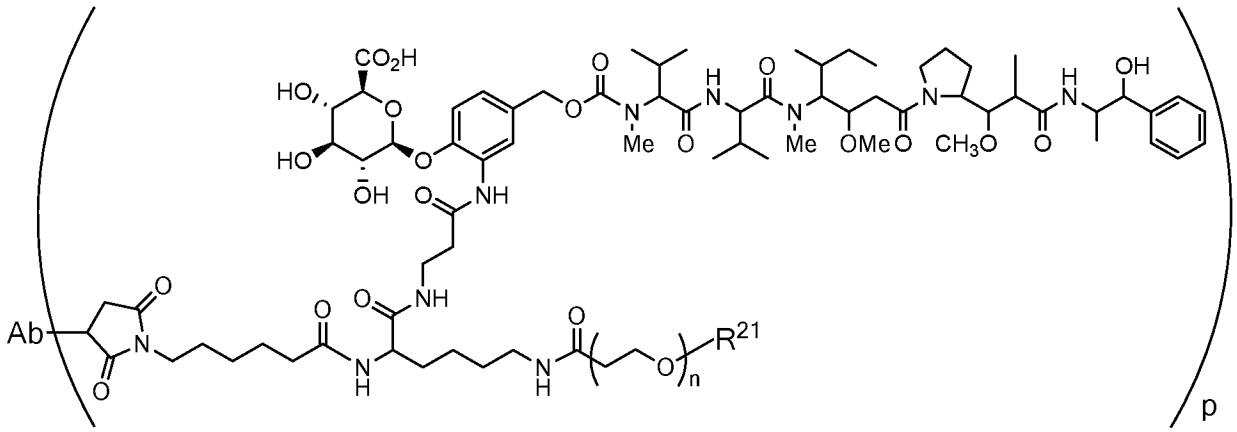
или является ее фармацевтически приемлемой солью.

[0012] Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



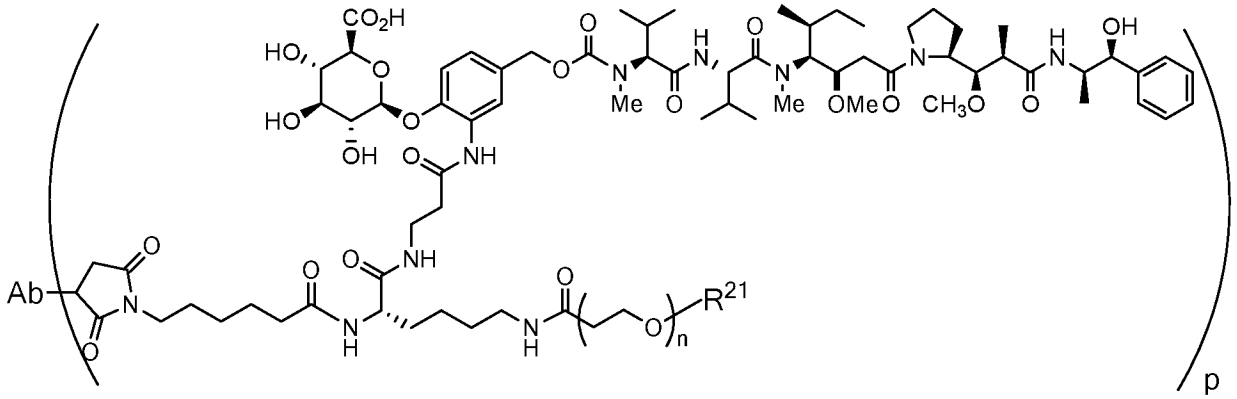
или является ее фармацевтически приемлемой солью, где R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу.

[0013] Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



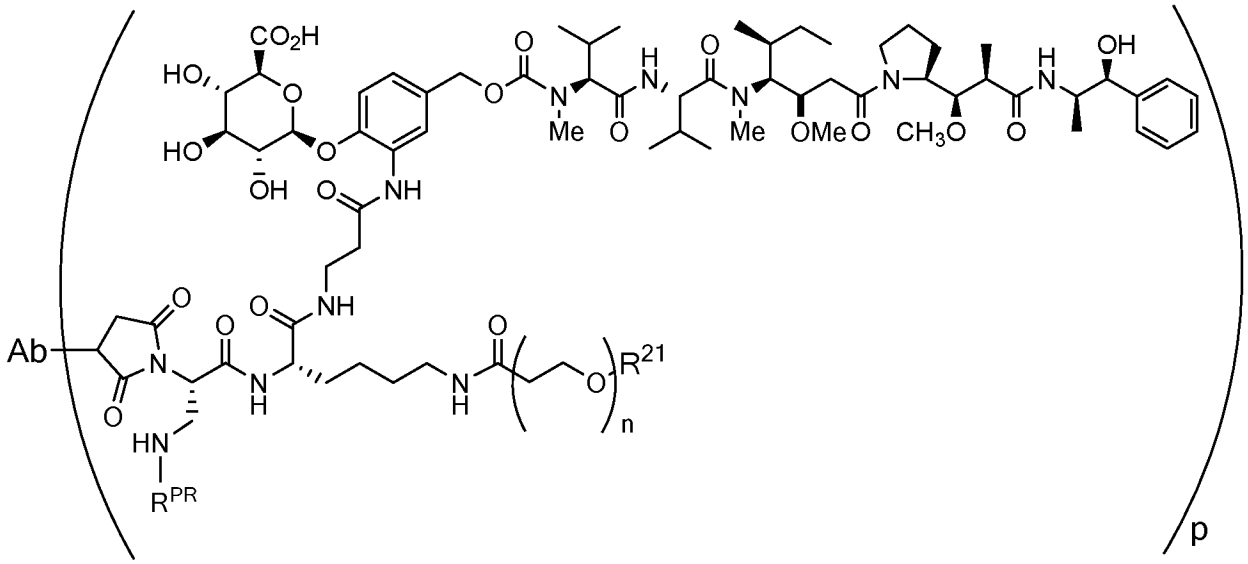
или является ее фармацевтически приемлемой солью.

[0014]Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью.

[0015]Другое типовое лекарственное средство-линкер для конъюгации с описанными антителами имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу.

[0016] В некоторых вариантах данного описания значение n

может находиться в диапазоне от 8 до 14. В других вариантах данного описания значение n находиться в диапазоне от 10 до 12. В дополнительном варианте реализации данного описания значение n составляет 12. В другом варианте реализации изобретения R^{21} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

[0017] В другом варианте реализации изобретения любое из описанных конъюгатов антител-лекарственных средств имеет значение p равное 8. В другом варианте реализации изобретения лекарственное средство-линкер присоединено к антителу посредством цистеиновых остатков межцепными дисульфидными связями антител.

[0018] В другом варианте реализации изобретения композиция конъюгата антитело-лекарственное средство содержит популяцию молекул конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства со средним значением нагрузки лекарственным средством равным 8 и с преобладающим значением нагрузки лекарственным средством в данной композиции равным 8.

[0019] В другом аспекте данного описания предложены фармацевтические композиции и составы, которые включают конъюгат антитело против CD48-лекарственное средство, описанный в данном документе.

[0020] В дополнительном аспекте изобретения конъюгаты антитело против CD48-лекарственное средство применяются для лечения пациентов больных раком, который экспрессирует CD48. Экспрессирующий CD48 рак, в одном варианте реализации изобретения, представляет собой множественную миелому. В других вариантах реализации изобретения экспрессирующий CD48 рак представляет собой B-клеточную неоплазию, например, неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, моноклональную гаммапатию неясного генеза (MGUS), макроглобулинемию Вальденстрема (WM), первичный/системный амилоидоз опухолевых клеток пациента и хроническую лимфоцитарную лейкемию. Другим примером экспрессирующего CD48 ракового заболевания, который можно лечить с использованием способов, описанных в данном документе, является острая миелогенная лейкемия.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0021] Термин «моноклональные антитело», в контексте данного документа, относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, которые являются идентичными за исключением возможных мутаций природного происхождения, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Модификатор «моноклональное» указывает на то, что антитело получено из практически гомогенной популяции антител, и его не следует интерпретировать как требование продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые предполагается применять в соответствии с настоящим изобретением, могут получать методом гибридом, впервые описанным Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495, или могут получать методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). Моноклональные антитела также можно выделять из фаговых библиотек антител с использованием методик, например, описанных в Clackson *et al.* (1991) *Nature,* 352:624-628 и Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.,* 222:581-597, или можно получать другими способами. Антитела, описанные в данном документе, являются моноклональными антителами.

[0022] Антитела, как правило, представлены в выделенной форме. Это означает, что как правило антитело обладает по меньшей мере 50% об./об. чистоты от мешающих белков и других загрязняющих веществ, возникающих при его продукции или очистке, но не исключая возможности того, что антитело комбинируется с избытком фармацевтически приемлемого (-ых) носителя (-ей) или другого наполнителя, предназначенного для облегчения использования антитела. В отдельных случаях антитела обладают по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95 или 99% мас./мас. чистоты от мешающих белков и загрязняющих веществ из этапа продукции или очистки. Антитела, включая выделенные антитела, можно конъюгировать с цитотоксическими средствами и предлагать их в качестве конъюгатов антитела и лекарственного средства.

[0023] «Выделенный» полинуклеотид относится к полинуклеотиду, которого идентифицировали и отделили и/или

выделили из компонентов его природного окружения.

[0024] Специфическое связывание моноклонального антитела с целевым антигеном означает аффинность, равную по меньшей мере 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} M^{-1}. Специфическое связывание по величине и различимости является выявляемо выше, чем неспецифическое связывание, происходящее по меньшей мере с одной необработанной мишенью. Специфическое связывание может представлять собой результат образования связей между конкретными функциональными группами или конкретным пространственным соответствием (например, типа «ключа и замка»), тогда как неспецифическое связывание обычно представляет собой результат действия сил Ван-дер-Ваальса. Конъюгаты антитела-лекарственного средства, направленные против CD48, и анти-CD48 антитела специфически связываются с CD48.

[0025] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер из субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну тяжелую цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельный участок из около от 100 до 110 или более аминокислот, главным образом отвечающих за распознавание антигена. Этот вариабельный участок первоначально экспрессируется связанным с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельный участок без сигнального пептида в отдельных случаях называется зрелым вариабельным участком. Таким образом, например, зрелый вариабельный участок легкой цепи означает вариабельный участок легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон и определяют изотип антитела как, соответственно, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. В пределах легкой и тяжелой цепи нижние и константные участки соединены посредством участка «J» из около 12 или более аминокислот, с включением также в тяжелую цепь участка «D» из около 10 или более аминокислот. (См., в целом, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7, которое включено в данный документ в полном объеме путем ссылки для всех целей).

Зрелые вариабельные участки каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют антителосвязывающий сайт. Таким образом, интактное антитело имеет два связывающих сайта. Все цепи проявляют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, также называемыми определяющими комплементарность участками или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выровнены каркасными участками, что дает возможность связываться со специфическим эпитопом. От N-конца до C-конца, и легкая и тяжелая цепь содержит домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Присвоение аминокислот к каждому домену происходит в соответствии с определениями Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Кабат также предложил широко применяемое правило нумерации (система нумерации Кабата), согласно которому соответствующим остаткам между различными вариабельными участками тяжелой цепи или между различными вариабельными участками легкой цепи присваиваются одинаковые номера. Нумерация константного участка тяжелой цепи происходит посредством индекса EU, как изложено в Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991).

[0026] Термин «антитело» включает интактные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. «Интактное антитело» представляет собой антитело, содержащее антигенсвязывающий вариабельный домен, а также константный домен легкой цепи (C_L) и константные домены тяжелой цепи, C_H1, C_H2, C_H3 и C_H4, как соответствует классу антитела. Константные домены могут быть константными доменами нативных последовательностей (например, константные домены нативных последовательностей человека) или их вариантами аминокислотных последовательностей. Фрагменты антител конкурируют с интактным антителом, из которого они получены, за специфическое связывание с мишенью, они включают отдельные Fab тяжелых цепей, легких цепей, Fab', $F(ab')_2$, F(ab)c, диатела, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно пролучать методиками

рекомбинантных ДНК, или ферментативным или химическим разделением интактных иммуноглобулинов. Термин «антитело» также включает диатело (гомодимерный фрагмент Fv) или минитело (V_L-V_H-C_H3), биспецифическое антитело или подобное антитело. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелой/легкой цепи и два различных сайта связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

[0027] Термин «пациент» включает человека и других млекопитающих субъектов, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0028] С целью классификации замен аминокислот как консервативных или неконсервативных, аминокислоты группируют следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): gly, pro и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают замены между аминокислотами того же класса. Неконсервативные замены представляют замену представителя одного из указанных классов представителем другого класса.

[0029] Процентные значения идентичностей последовательностей определяют по последовательностям антител, максимально выровненных по правилу нумерации Кабата. После выравнивания, если исследуемый участок антитела (например, целый зрелый вариабельный участок тяжелой или легкой цепи) сравнивается с аналогичным участком эталонного антитела, то процентное значение идентичности последовательностей между участками исследуемого и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых одной и той же аминокислотой на участке исследуемого и эталонного антитела, разделенное на общее количество выровненных положений данных двух участков, без учета гэпов, умноженное на 100 для преобразования в процентное

значение.

[0030] Композиции или способы, «включающие» один или более перечисленных элементов, могут включать другие элементы, которые специально не перечислялись. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать только антитело или оно будет находится в комбинации с другими ингредиентами.

[0031] Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству конъюгата антитела-лекарственного средства, которое эффективно для лечения у млекопитающего заболевания или нарушения. В случае ракового заболевания, терапевтически эффективное количество конъюгата может снижать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т. е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т. е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать рост опухоли и/или облегчать один или более симптомов, связанных с данным раковым заболеванием. Для терапии рака эффективность может, например, быть измерена путем оценки периода времени до прогрессирования заболевания (TTP) и/или определения уровня ответов (RR). Термин «эффективный режим» относится к комбинации количества вводимого конъюгата и частоты дозировки, необходимой для проведения лечения нарушения.

[0032] Термины «лечить» или «лечение», если контекстом не указано иное, относится как к терапевтическому лечению, при котором у объекта должно ингибироваться или замедляться (уменьшаться) нежелательное физиологическое изменение или нарушение, такое как развитие или распространение рака. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ослаблением симптомов, уменьшением степени заболевания, стабилизацией (т. е. отсутствием ухудшения) течения заболевания, задержкой или замедлением прогрессирования заболевания, облегчением или временным облегчением болезненного состояния и ремиссией (частичной или полной), как выявляемыми, так и невыявляемыми. «Лечение» может также означать повышение периода выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью

пациента, который не получает лечения. Нуждающиеся в получении лечения включают тех пациентов, у которых заболевание выявляется. Нуждающиеся в получении лечения могут также включать тех пациентов, у которых заболевание не выявляется, например, пациентов, которые достигли полного ответа после лечения нарушения с экспрессией CD48, но нуждающихся в терапии для того чтобы предотвратить рецидив.

[0033] Термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный или допускающий одобрение регуляторным ведомством Федерального правительства или правительства штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека. Термин "фармацевтически совместимый ингредиент» относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адъюванту, наполнителю или носителю, с которым анти-CD48 антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство вводится субъекту.

[0034] Фраза «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям. Типовые соли включают сульфатные, цитратные, ацетатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, гидрофосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, гидроцитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкуронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные соли (т. е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такой как, ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоионом может быть любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может содержать в своей структуре более одного заряженного атома. В случаях, где несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически

приемлемой соли, она может содержать несколько противоионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может содержать один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

[0035] Сольваты, в контексте данного изобретения, представляют собой такие формы соединений по данному изобретению, что они образуют комплекс в твердом или жидком состоянии через координацию молекул сольвента. Гидраты представляют собой одну конкретную форму сольватов, в которых координация происходит с водой. Предпочтительные сольваты, в контексте настоящего изобретения, представляют собой гидраты.

[0036] Если только из контекста не является очевидным, термин «около» охватывает значения в пределах стандартного отклонения указанного значения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0037] На Фиг. 1 показаны аминокислотные последовательности вариабельного участка тяжелой цепи мышиного антитела MEM102 и гуманизированной тяжелой цепи vHA, vHB и vHC, и выбранные последовательности акцепторного вариабельного участка зародышевой линии человека.

[0038] На Фиг. 2 показаны аминокислотные последовательности вариабельного участка легкой цепи мышиного антитела MEM102 и гуманизированной легкой цепи vLA, vLB и vLC, и выбранные последовательности акцепторного вариабельного участка зародышевой линии человека.

[0039] На Фиг. 3 показаны кривые насыщения связывания для антител MEM102 на клетках U-266 множественной миеломы человека.

[0040] На Фиг. 4 показаны кривые насыщения связывания для антител MEM102 на клетках CHO, трансфецированных CD48 яванского макака.

[0041] На Фиг. 5 показана активация каспазы 3/7 (апоптическая гибель клеток) в клетках NCI-H929 множественной миеломы человека после лечения с помощью ADC MEM-102.

[0042] На Фиг. 6 показана активация каспазы 3/7 в клетках U-266 множественной миеломы человека после лечения с помощью ADC MEM-102.

[0043] На Фиг. 7 показана активность *in vivo* ADC hMEM102 в модели ксенотрансплантата мыши, имплантированного клетками NCI-H929. Это диссеминированная модель множественной миеломы.

[0044] На Фиг. 8 показана активность *in vivo* ADC hMEM102 в модели ксенотрансплантата мыши, имплантированного клетками NCI-H929. Это подкожная модель множественной миеломы.

[0045] На Фиг. 9 показана активность *in vivo* ADC hMEM102 в модели ксенотрансплантата мыши, имплантированного клетками MM.1R. Это диссеминированная модель множественной миеломы.

[0046] На Фиг. 10 показана активность *in vivo* ADC hMEM102 в модели ксенотрансплантата мыши, имплантированного клетками MM.1R. Это подкожная модель множественной миеломы.

[0047] На Фиг. 11 показана активность *in vivo* ADC hMEM102 в модели ксенотрансплантата мыши, имплантированного клетками EJM. Это диссеминированная модель множественной миеломы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0048] Настоящее изобретение, в частности, основано на открытии того, что конъюгаты антитела-лекарственного средства, включая конъюгаты пэгилированного-MMAE антитела-лекарственного средства, направленные на CD48, которые особенно эффективны в уничтожении экспрессирующих CD48+ клеток. В частности, было обнаружено, что высокая аффинность гуманизированного антитела MEM102 может быть сконструирована с использованием как акцепторной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи hIgG VH7-4-1/hIgG-JH5 вариабельного участка тяжелой цепи зародышевой линии человека. Для вариабельного участка легкой цепи предпочтительная акцепторная последовательность представляет собой вариабельный участок легкой цепи hIgG-VK6-21/hIgG-JK4 зародышевой линии человека. Примечательно, что гуманизированное антитело MEM102 с высокой активностью сконструировано без необходимости выполнения созревания аффинности и при этом с сохранением идентичности CDR мышиного антитела. Гуманизированное антитело MEM102 с высокой активностью также было эффективно при доставке лекарственного средства как части конъюгата антитела и лекарственного средства. В случае конъюгирования с SGD-5088 пэгилированным-MMAE, полученный

конъюгат с 8-кратной нагрузкой hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE, был высокоактивным против панели линий клеток множественной миеломы.

Целевые молекулы

[0049] Если не указано иное, CD48 относится к CD48 человека. Типовой человеческой последовательности присвоен номер доступа Genbank CAG33293.1.

Антитела по данному изобретению

[0050] Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR от нечеловеческого антитела-«донора» привиты на последовательности человеческого антитела-«акцептора» (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205 и Foote, US 6881557). Последовательности антитела-акцептора могут быть, например, зрелой последовательностью антитела человека, совокупностью таких последовательностей, консенсусной последовательностью последовательностей антител человека или последовательностью участка зародышевой линии.

[0051] Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее некоторые или все CDR, целиком или в основном из нечеловеческого антитела-донора, каркасные последовательности вариабельных участков и константные участки, если присутствуют, целиком или в основном из последовательностей человеческих антител. Сходным образом, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одно, два и обычно все три CDR, целиком или в основном из тяжелой цепи антитела-донора, каркасную последовательность вариабельного участка тяжелой цепи и константный участок тяжелой цепи, если присутствуют, в основном из последовательностей вариабельного участка каркасных и константных участков тяжелой цепи человека. Сходным образом, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одно, два и обычно все три CDR, целиком или в основном из легкой цепи антитела-донора, и каркасной последовательности вариабельного участка легкой цепи и константного участка легкой цепи, если присутствуют, в основном из последовательностей

вариабельного участка каркасных и константных участков легкой цепи человека. Отличное от нанотел и диател гуманизированное антитело, как правило, содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном или человеческом антителе состоит в основном из или практически идентичный соответствующему CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Кабату) идентичны у соответственных CDR. В некоторых вариантах реализации изобретения CDR в гуманизированном или человеческом антителе состоит в основном из или практически идентичный соответствующему CDR в нечеловеческом антителе, когда в каждом CDR имеется по меньшей мере не более 3 консервативных аминокислотных замен. Каркасные последовательности вариабельного участка цепи антитела или константного участка цепи антитела походят в основном из каркасной последовательности вариабельного участка человека или константного участка человека, когда являются идентичными по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Кабату. В некоторых гуманизированных антителах по данному изобретению не существует обратных мутаций в вариабельном каркасном участке тяжелой цепи антитела и не существует обратных мутаций в вариабельном каркасном участке легкой цепи антитела.

[0052] Хотя антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно как определено по Кабату) из антитела мыши, они также могут быть созданы из менее чем всего набора CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR из антитела мыши (например, Pascalis *et al.*, *J. Immunol*. 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol*. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

[0053] Определенные аминокислоты из каркасных остатков вариабельного участка могут выбираться для замены на основе их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний проводится путем моделирования, изучения свойств аминокислот в конкретных

положениях или эмпирическом наблюдении эффектов замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

[0054] В изобретении представлены антитела, направленные против антитела CD48. Предпочтительные антитела являются химерными или гуманизированными антителами, полученными из мышиного антитела MEM102.

Предпочтительная акцепторная последовательность для вариабельного остатка тяжелой цепи представляет собой вариабельный участок тяжелой цепи VH7-4-1/hIgG-JH5 зародышевой линии человека. Для вариабельного участка легкой цепи, предпочтительная акцепторная последовательность представляет собой вариабельный участок легкой цепи hIgG-VK6-21/hIgG-JK4 зародышевой линии человека.

[0055] Типовое анти-CD48 антитело представляет собой гуманизированное антитело, которое содержит CDR тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:1, и CDR легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:2, и дополнительно имеет зрелый вариабельный участок тяжелой цепи с по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью SEQ ID NO:1 и зрелый вариабельный участок легкой цепи с по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью SEQ ID NO:2. CDR определены по Кабату.

[0056] Гуманизированные формы антитела MEM102 мыши содержат три иллюстративных гуманизированных зрелых вариабельных участка тяжелой цепи (HA-HC) и три иллюстративных гуманизированных зрелых вариабельных участка легкой цепи (LA-LC). Перестановки этих цепей включают HALA, HALB, HALC, HBLA, HBLB, HBLC, HCLA, HCLB и HCLC. Из этих перестановок предпочтительной является HALA. HALA содержит тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, указанную в SEQ ID NO:2. Вместо HALA можно использовать любую из HALB, HALC, HBLA, HBLB, HBLC, HCLA, HCLB и HCLC.

[0057] В некоторых аспектах изобретения кажущаяся константа диссоциации (kd) гуманизированных антител MEM102 для CD48 человека предпочтительно находится в диапазоне от 0,1 нМ до 10 нМ, даже предпочтительнее в диапазоне от 0,1 нМ до 5 нМ, даже предпочтительно в диапазоне от 1 нМ до 3 нМ или от 2 нМ до около

3 нМ. В одном аспекте изобретения антитела по данному изобретению имеют кажущуюся константу диссоциации в диапазоне от 0,1 до 2,0 раз или даже от 0,5 до 4 раз кратную значению кажущейся константы диссоциации мышиного антитела MEM102 для CD48 человека. В некоторых аспектах изобретения значение кажущейся константы диссоциации (kd) антител для CD48 человека составляет около 5,0.

Выбор константного участка

[0058] Вариабельные участки тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител MEM102 можно связывать с по меньшей мере частью константного участка человека. Выбор константного участка может зависеть, в частности, от необходимости наличия антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, антителозависимого клеточного фагоцитоза и/или комплементзависимой цитотоксичности. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека обладают сильной комплементзависимой цитотоксичностью, изотип IgG2 обладает слабой комплементзависимой цитотоксичностью, а у IgG4 человека отсутствует комплементзависимая цитотоксичность. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные участки легкой цепи могут быть лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться как тетрамеры, содержащие две легкие и две тяжелые цепи, как отдельные тяжелые цепи, легкие цепи, как Fab, Fab', F(ab')2 и Fv, или как одноцепочечные антитела, в которых нижние домены тяжелой и легкой цепи связаны посредством спейсера.

[0059] Константные участки человека показывают аллотипичную вариацию и изоаллотипичную вариацию между отдельными индивидами, а именно, константные участки могут отличаться у различных индивидов по одному или более полиморфных положений. Изоаллотипы отличаются от аллотипов, в которых сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с неполиморфным участком одного или более других изотипов.

[0060] В части или всех молекулах могут отсутствовать или быть дериватизированы одна или несколько аминокислот на амино-

или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи. Замены можно выполнять в константных участках для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как комплементопосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для продления период полувыведения у людей (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

[0061] Константный участок можно модифицировать для обеспечения сайтспецифической конъюгации лекарственного средства-линкера. Такие методики включают применение цистеиновых остатков природного происхождения или сконструированных цистеиновых остатков, дисульфидных мостиков, полигистидиновых последовательностей, гликосконструированных маркеров и последовательностей распознавания трансглутаминазы. Типовая замена для сайтспецифической конъюгации с использованием бактериальной трансглутаминазы представляет собой N297S или N297Q. Типовая замена для сайтспецифической конъюгации с использованием сконструированного цистеина собой S239C. Фрагменты антител также можно модифицировать для проведения сайтспецифической конъюгации лекарственного средства-линкера, см. например Kim et al., *Mol Cancer Ther* 2008;7(8).

Экспрессия рекомбинантных антител

[0062] Гуманизированное или химерное антитело MEM102 можно получать путем рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции, как правило, включают последовательности с контролем экспрессии, функционально связанные с кодирующими последовательностями цепей антител, включая ассоциированные естественным образом или гетерологичные промоторные участки. Предпочтительно, последовательности с контролем экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способные к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев. После включения вектора в соответствующего хозяина, хозяин поддерживается в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных

последовательностей, а также сбора и очистки перекрестнореагирующих антител.

[0063] Клетки млекопитающих являются предпочтительным хозяином для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают линии клеток CHO (например, DG44), различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и не продуцирующие антитела миеломы, включающие Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки являются нечеловеческими клетками. Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать последовательности с контролем экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как связывающие рибосому сайты, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности транскрипционных терминаторов. Предпочтительные последовательности с контролем экспрессии представляют собой промоторы, происходящие из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, папилломавируса крупного рогатого скота и тому подобные. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[0064] После экспрессии антитела можно очищать в соответствии со стандартными процедурами данной области техники, включая ВЭЖХ-очистку, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и тому подобные методы (см., в целом, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Нуклеиновые кислоты

[0065] В изобретении дополнительно предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из гуманизированных тяжелой и легкой цепей, описанных в данном документе. Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый со зрелыми вариабельными участками тяжелой и легкой цепи. Кодирующие последовательности на нуклеиновых кислотах могут находиться в функциональной связи с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии данных кодирующих последовательностей,

такими как промотор, энхансер, связывающий рибосому сайт, сигнал терминации транскрипции и тому подобными. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут встречаться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать, например, путем твердофазного синтеза или ПЦР перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены как одна непрерывная нуклеиновая кислота, например, в пределах экспрессионного вектора или могут быть разделенными, например, каждая клонирована в своем экспрессионном векторе.

[0066] В одном варианте реализации изобретения в данном описании предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельный участок тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в HA, HB или HC. Например, выделенный полинуклеотид может кодировать вариабельный участок тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. Выделенный полинуклеотид может дополнительно кодировать константный участок тяжелой цепи IgG человека. Изотип константного участка IgG представляет собой, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте реализации изобретения изотип константного участка IgG представляет собой IgG1. В другом варианте реализации изобретения кодированный константный участок IgG1 имеет аминокислотную последовательность, содержащую замену по остатку 239, в соответствии индексом EU, как указано в системе Кабата, т. е. S239C. В описании также предложен экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельный участок тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в HA, HB или HC (например, SEQ ID NO:1 или ее вариант), и дополнительно, клетка-хозяина, содержащая такой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой хозяйскую клетку млекопитающего, например клетку CHO.

[0067] В другом варианте реализации изобретения в данном описании предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий

вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в LA, LB или LC. Например, выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. Выделенный полинуклеотид может дополнительно кодировать константный участок легкой цепи IgG человека. Изотип константного участка легкой цепи IgG представляет собой, например, константный участок каппа. В описании также предложен экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в LA или LB, или LC (например, SEQ ID NO:2 или ее вариант), и дополнительно, клетка-хозяина, содержащая такой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой хозяйскую клетку млекопитающего, например клетку CHO.

[0068] В другом варианте реализации изобретения в данном описании предложен выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие вариабельный участок тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, образующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека. В данном описании также предложен экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие вариабельный участок тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. Предложена также клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор или векторы. Клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего, например клетку CHO.

[0069] В другом варианте реализации изобретения в данном описании предложен первый и второй векторы, содержащие полинуклеотид, кодирующий вариабельный участок тяжелой цепи

антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и полинуклеотид, кодирующий вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, образующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека. Предложена клетка-хозяин, содержащая векторы, предпочтительно, клетки-хозяева млекопитающих, такие как клетка CHO.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

[0070] Анти-CD48 антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими средствами, диагностическими средствами или стабилизирующими средствами с образованием конъюгатов антител. Анти-CD48 антитела, конъюгированные с терапевтическими средствами называются в данном документе конъюгатами антитела-лекарственного средства (ADC). Типовые терапевтические средства обладают цитостатическим или цитотоксическим действием и также могут относится к цитотоксическим или цитостатическим средствам. Типовые цитотоксические средства включают, например, ауристатины, камптотецины, калихеамицины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды (например, DM1, DM2, DM3, DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло[1,4]бензодиазепины, индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины, включая димеры пирроло[1,4]бензодиазепинов, димеры индолинобензодиазепинов и димеры оксазолидинобензодиазепинов) и алкалоиды барвинка.

[0071] Методики для конъюгирования терапевтических средств с белками, и в частности с антителами, хорошо известны (см., например, Alley et al., Current Opinion in Chemical Biology 2010 14:1-9; Senter, Cancer J., 2008, 14(3):154-169). Как правило, терапевтическое средство конъюгировано с антителом посредством линкерной единицы. Линкерная единица может быть отщепляемой или неотщепляемой. Например, терапевтическое средство может быть присоединено к антителу с помощью отщепляемого линкера, который чувствителен к отщеплению во внеклеточном окружении CD48-экспрессирующей раковой клетки, но практически не чувствителен к внеклеточному окружению, так что конъюгат отщепляется от

антитела, когда он интернализирован CD48-экспрессирующей раковой клеткой (например, в эндосомальном, лизосомальном окружении или в кавеолярном окружении). В другом примере терапевтическое средство может быть конъюгировано с антителом посредством неотщепляемого линкера и высвобождение лекарственного средства происходит путем полного разрушения антитела с последующей интернализацией CD48-экспрессирующей раковой клеткой.

[0072] Как правило, ADC будет содержать линкерный участок между цитотоксическим или цитостатическим средством и анти-CD48 антителом. Как отмечено выше, линкер может быть отщепляемым во внутриклеточных условиях, таких что отщепление линкера высвобождает терапевтическое средство от антитела во внутриклеточном окружении (например внутри лизосомы или эндосомы, или кальвеолы). Линкер может быть, например, пептидильным линкером, который отщепляется внутриклеточным пептидазным или протеазным ферментом, включающим лизосомальную или эндосомальную протеазу. Отщепляющие средства могут включать катепсины B и D, и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999). Наиболее часто пептидильные линкеры являются отщепляемыми ферментами, которые присутствуют в CD48-экспрессирующих клетках. Например, пептидильный линкер является отщепляемым тиолзависимой протеазой катепсин-B, которая в высокой степени экспрессируется в раковой ткани, может использоваться (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Val-Cit). Линкер также может быть углеводным линкером, включающим линкер-сахар, который отщепляется внутриклеточной гликозидазой (например, глюкуронидный линкер, отщепляемый глюкоронидазой).

[0073] Линкер также может быть неотщепляемым линкером, таким как малеимидо-алкиленовый малеимидо-арильный линкер, который непосредственно присоединен к терапевтическому средству и высвобождается протеолитическим разрушением антитела.

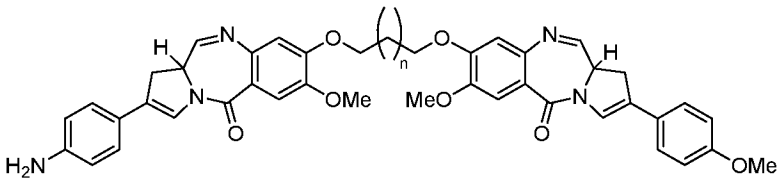
[0074] Анти-CD48 антитело может быть конъюгировано с линкером посредством гетероатома антитела. Эти гетероатомы могут присутствовать на антителе в своем естественном состоянии или могут быть введены в антитело. В некоторых аспектах изобретения

анти-CD48 антитело будет конъюгировано с линкером посредством атома азота или лизинового остатка. В некоторых аспектах изобретения анти-CD48 антитело будет конъюгировано с линкером посредством атома серы или цистеинового остатка. Цистеиновый остаток может быть встречающимся в природе или таким, который введен в антитело конструированием. Способы конъюгирования линкеров и лекарственных средств-линкеров с антителами посредством лизиновых и цистеиновых остатков известны в данной области техники.

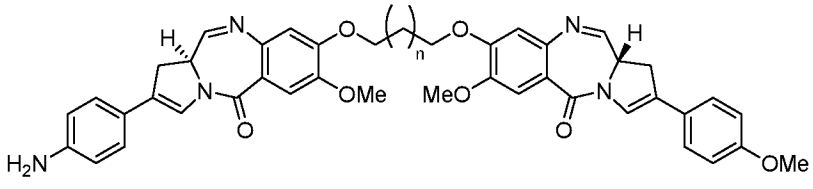
[0075] Типовые конъюгаты антитела-лекарственного средства включают конъюгаты антитела-лекарственного средства на основе ауристатина (т. е. компонент лекарственного средство представляет собой лекарственное средство ауристатин). Было показано, что ауристатины влияют на динамику роста микротрубочек и ядерное и клеточное деление, и обладают противораковой активностью. Как правило, конъюгат антитела-лекарственного средства на основе ауристатина содержит линкер между лекарственным средством ауристатином и анти-CD48 антителом. Линкер может быть, например, отщепляемым линкером (например пептидильный линкер, углеводный линкер) или неотщепляемым линкером (например линкер, высвобождаемый путем деградации антитела). Ауристатины включают MMAF и MMAE. Синтез и структура типовых ауристатинов описаны в публикациях США № 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждая из которых включена в данный документ путем ссылки в полном объеме и во всех смыслах.

[0076] Другие типовые конъюгаты антитела-лекарственного средства включают майтанзиноидные конъюгаты антитела-лекарственного средства (т. е. компонент лекарственного средства представляет собой лекарственное средство майтанзиноид) и бензодиазепиновые конъюгаты антитела-лекарственного средства (например димеры пирроло[1,4]бензодиазепина (димер PBD), димеры индолинобензодиазепина и димеры оксалидинобензодиазепина)).

[0077] Предпочтительный для применения димер PBD в настоящем изобретении представлен формулой I. Предпочтительная стереохимия димера PBD такая, как показана в формуле Ia:



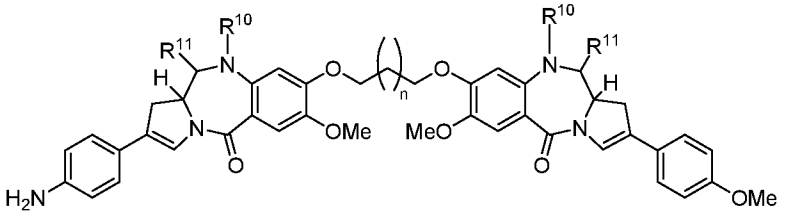
(I)



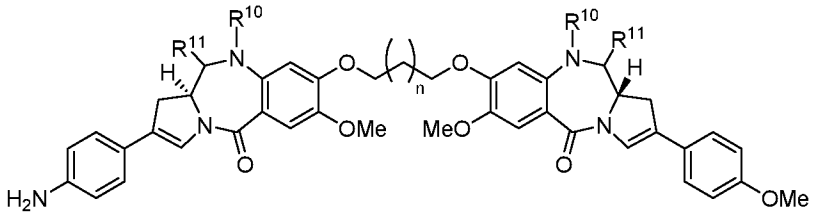
(Ia)

или является фармацевтической солью, сольватом или сольватом этой соли, где нижний индекс n равен 1 или 3.

[0078] Сольваты формулы (I) и (Ia), как правило, образуются при добавлении воды или спиртового растворителя через иминную функциональную группу одного или обоих мономеров PBD с образованием карбиноламина (-ов) и/или карбиноламинных простых эфиров. Например, положение N10-C11 может быть имином (N=C), карбиноламином (NH-CH(OH)) или карбиноламиновым простым эфиром (NH-CH(OMe)), как представлено ниже формулами I' и Ia'.



(I')



(Ia')

где:

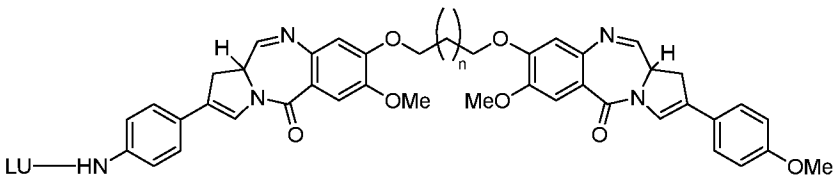
(a) R^{10} представляет собой H, а R^{11} представляет собой OH или OR^A, где R^A представляет собой насыщенный C_{1-4} алкил (предпочтительно метил); или

(b) R^{10} и R^{11} образует азот-углеродную двойную связь между атомами азота и углерода, с которым они связаны; или

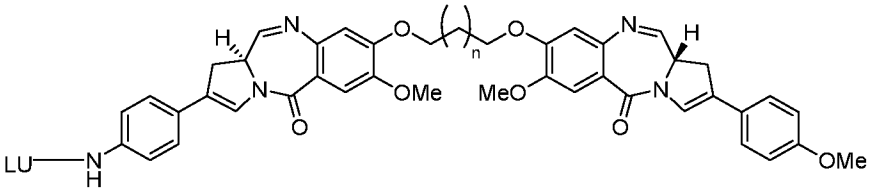
(c) один из R^{10} представляет собой H, а R^{11} представляет собой OH или OR^A, где R^A представляет собой насыщенный C_{1-4} алкил (предпочтительно метил), а другой из R^{10} и R^{11} образует азот-углеродную двойную связь между атомами азота и углерода, с

которым они связаны.

[0079] Димер PBD формулы I или Ia (или фармацевтическая соль, сольват или сольват его соли) как правило связан с антителом посредством линкерной единицы, LU. Линкерная единица действует так чтобы димер PBD формулы I или Ia (или фармацевтическая соль, сольват или сольват его соли) высвобождался в целевом сайте (например, внутри раковой клетки). PBD-соединение лекарственного средства-линкера для применения в настоящем изобретении представлено ниже формулой II (с предпочтительной стереохимией, показанной в IIa), где LU представляет собой линкерную единицу. Линкерная единица может быть, например, отщепляемой пептидной линкерной единицей (например, линкер, содержащий пептид валин-аланин) или отщепляемой дисульфидной линкерной единицей:



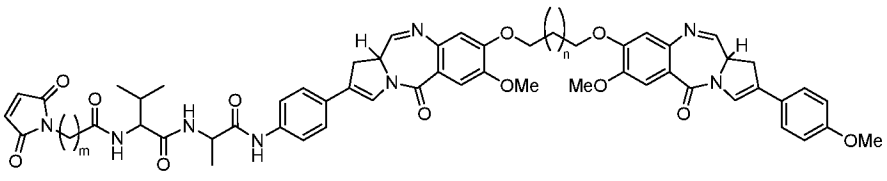
(II)



(IIa)

или является фармацевтической солью, сольватом или сольватом этой соли, где нижний индекс n равен 1 или 3.

[0080] Предпочтительное BD-соединение лекарственного средства-линкера для применения в настоящем изобретении представлено ниже формулой III:

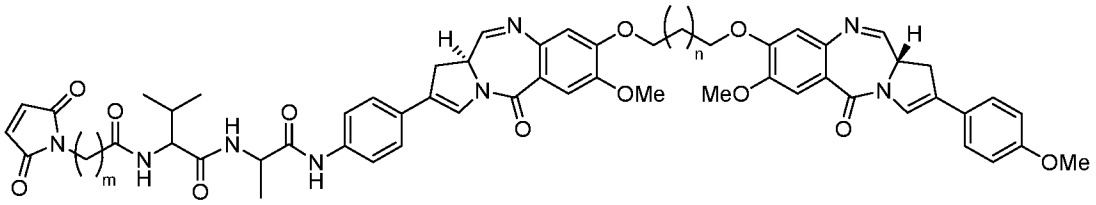


(III)

или является фармацевтической солью, сольватом или сольватом этой соли, где нижний индекс n равен 1 или 3, а нижний индекс m равен целому числу от 2 до 5.

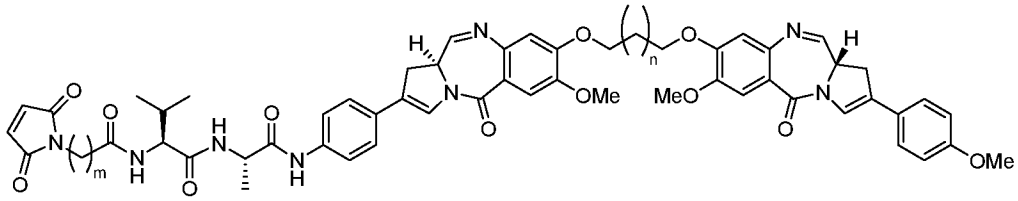
[0081] Предпочтительная стереохимия компонента лекарственного средства PBD лекарственного средства-линкера

такая, как показана ниже в формуле IIIa:



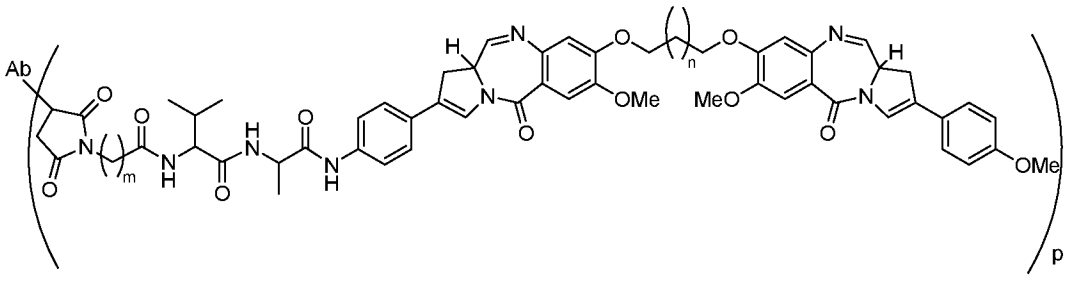
(IIIa).

[0082] Предпочтительная стереохимия компонентов лекарственного средства PBD и линкера такая, как показана ниже в формуле IIIb:

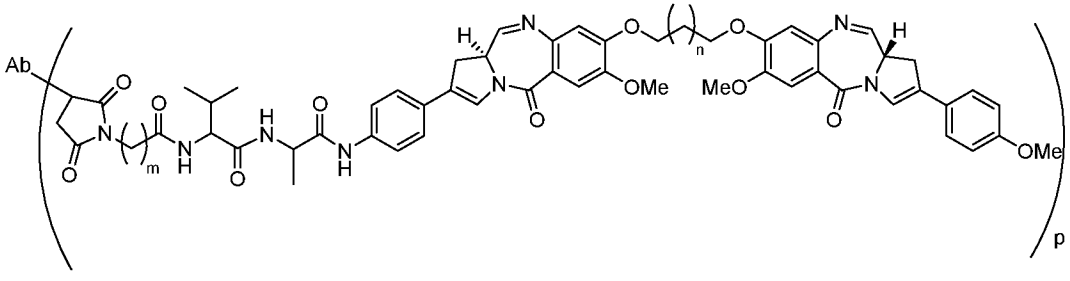


(IIIb).

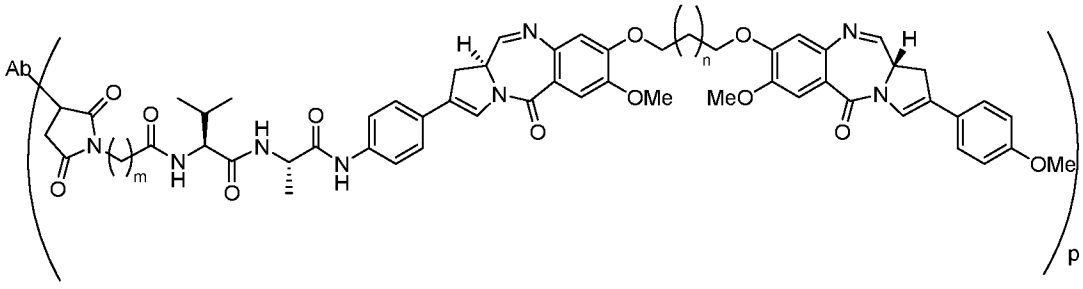
[0083] Лекарственное средство PBD-линкер конъюгируют с анти-CD48 антителом для получения нацеленного на CD48 конъюгата антитела-лекарственного средства. Например, антитело можно конъюгировать с лекарственным средством-линкером формулы II или формулы III. Типовой нацеленный на CD48 конъюгат антитела-лекарственного средства показан ниже в формулах IV, IVa и IVb:



(IV)



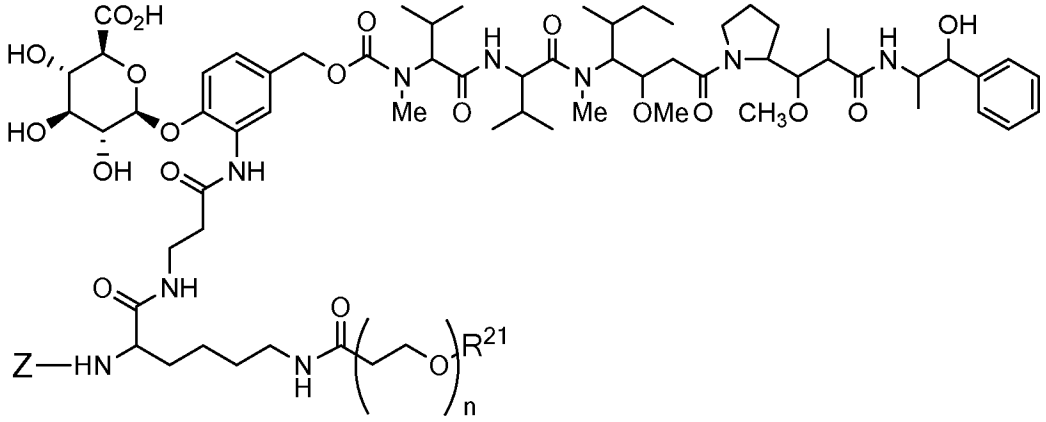
(IVa)



(IVb)

или является фармацевтической солью, сольватом или сольватом этой соли, где нижний индекс n равен 1 или 3; нижний индекс m равен целому числу от 2 до 5; а нижний индекс p составляет от 1 до 4.

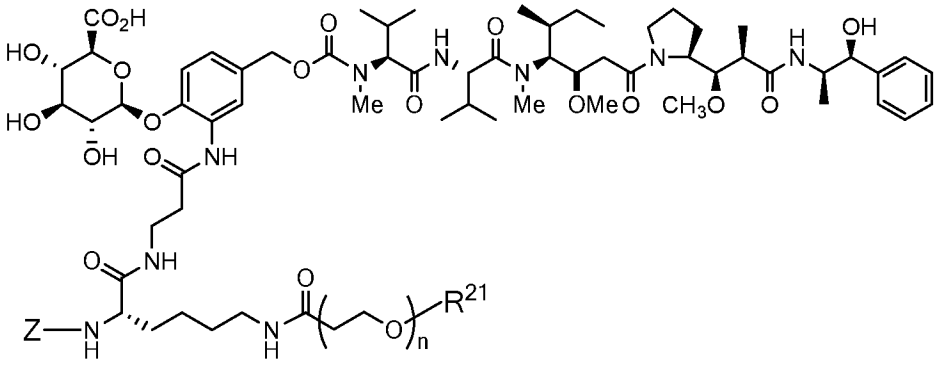
[0084] Типовые лекарственные средства-линкеры включают лекарственные средства MMAE-линкеры. Авторами-исследователями обнаружено, что включение полимера полиэтиленгликоля в качестве боковой цепи в отщепляемое β-глюкуронидное лекарственное средство MMAE-линкер обеспечивает получение конъюгатов лекарственного средства и антитела с уменьшенным выведением из плазмы и увеличенной противоопухолевой активностью в моделях ксенотрансплантатов по сравнению с не-ПЭГилированным контролем. Соответственно, в частности, преимущественные лекарственные средства-линкеры для присоединения к антителу по данному изобретению являются следующими:



(V)

или являются их фармацевтически приемлемой солью.

[0085] Предпочтительная стереохимия для такого лекарственного средства-линкера показана ниже:

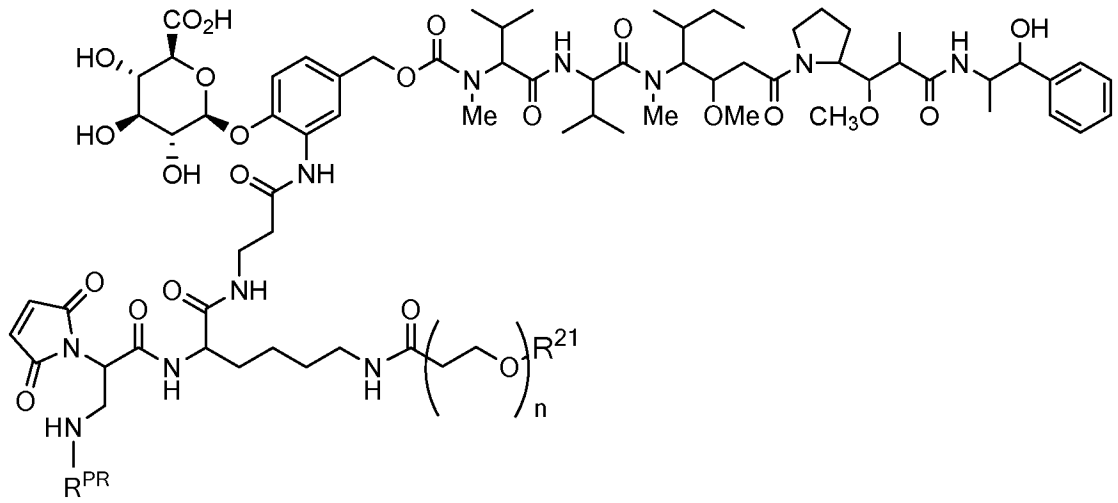


(Va)

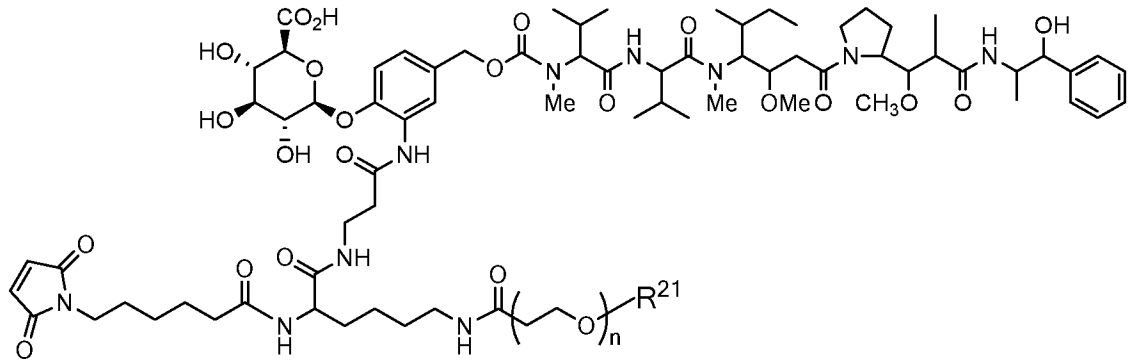
или его фармацевтически приемлемая соль, где для формул V и Va, Z представляет собой органический фрагмент, содержащий

реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, для образования с ней ковалентного соединения, n находится в диапазоне от 8 до 36, а наиболее предпочтительно находится в диапазоне от 8 до 14 (наиболее предпочтительно 12), R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля, предпочтительно $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

[0086] Предпочтительный фрагмент Z представляет собой малеимид-содержащий фрагмент. В частности, предпочтительные фрагменты Z показаны ниже в лекарственных средствах-линкерах:



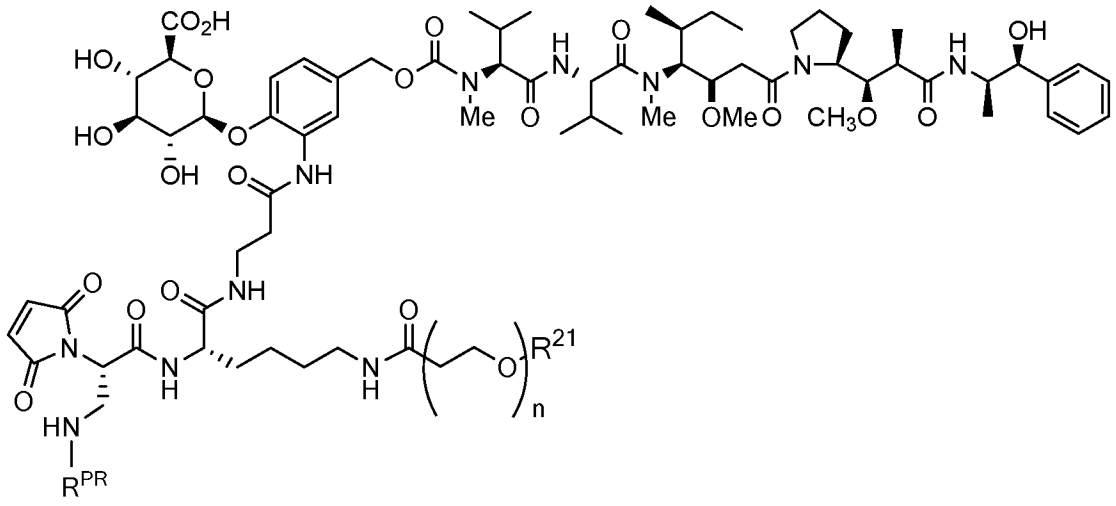
(VI)



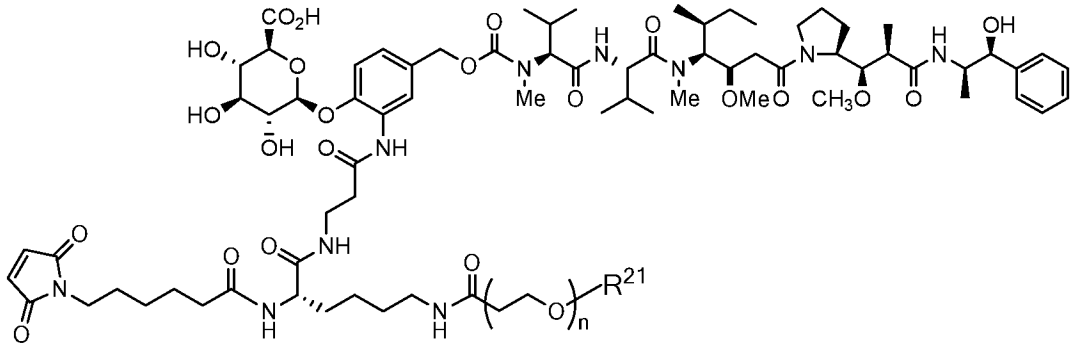
(VII)

или являются их фармацевтически приемлемой солью.

[0087]Предпочтительная стереохимия для таких лекарственных средств-линкеров показана ниже:



(VIa)



(VIIa)

или их фармацевтически приемлемая соль, где для формул VI, VIa, VII и VIIa, n находится в диапазоне от 8 до 36, а наиболее предпочтительно находится в диапазоне от 8 до 14 (наиболее предпочтительно 12), R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, например, кислотолабильную защитную группу, например BOC, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля, предпочтительно $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

[0088] Как отмечено выше, R^{PR} может быть атомом водорода или защитной группой. Защитные группы, как используются в данном документе, относятся к группам, которые избирательно блокируют либо временно, либо постоянно реакционноспособный сайт в многофункциональном соединении. Защитная группа является подходящей защитной группой, когда она способна предотвращать или делать невозможными нежелательные побочные реакции, или преждевременная потеря защитной группы в условиях реакции требуется для влияния на требуемое химическое превращение в любом другом месте в данной молекуле и, если требуется, во время очистки новообразованной молекулы, и может удаляться в условиях, которые не оказывают неблагоприятного воздействия на структуру

или стереохимическую целостность новообразованной молекулы. Подходящие аминные защитные группы включают кислотолабильные азотсодержащие защитные группы, включающие предложенные Isidro-Llobel et al. "Amino acid-protecting groups" *Chem. Rev.* (2009) 109: 2455-2504. Как правило, кислотолабильная азотсодержащая защитная группа превращает первичную или вторичную аминогруппу в соответствующей ей карбамат и включает т-бутил-, аллил- и бензилкарбаматы.

[0089] Как отмечено выше, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля. Как будет понятно специалисту в данной области, единицы полиэтиленгликоля могут быть терминально кэппированы большим разнообразием органических фрагментов, как правило тех, которые относительно нереакционноспособны. Предпочтительными являются алкильные и замещенные алкильные группы, включающие, например, $-C_{1-10}$ алкил, $-C_{2-10}$ алкил-CO_2H, $-C_{2-10}$ алкил-OH, $-C_{2-10}$ алкил-NH_2, C_{2-10} алкил-NH(C_{1-3} алкил) или C_{2-10} алкил-N(C_{1-3} алкил)$_2$.

[0090] В целом, существует от 1 до 16 лекарственных средств-линкеров, присоединенных к каждому антителу.

Лекарственная нагрузка - «p»

[0091] По отношению к нацеленным на CD48 конъюгатам антитела-лекарственного средства, нижний индекс p представляет собой лекарственную нагрузку и, в зависимости от контекста, может представлять количество молекул из молекул лекарственного средства-линкера, присоединенных к отдельной молекуле антитела, и по существу представлять собой целое значение или может представлять среднюю лекарственную нагрузку, и по существу может быть целым или нецелым значением, но как правило нецелое значение. Средняя лекарственная нагрузка представлена в популяции средним количеством молекул лекарственного средства-линкера на антитело. Часто, но не всегда, если авторами подразумевается антитело, например моноклональное антитело, то авторы подразумевают популяцию молекул антител. В композиции, содержащей популяцию молекул конъюгатов антитело-лекарственное средство, среднее значение лекарственной нагрузки является

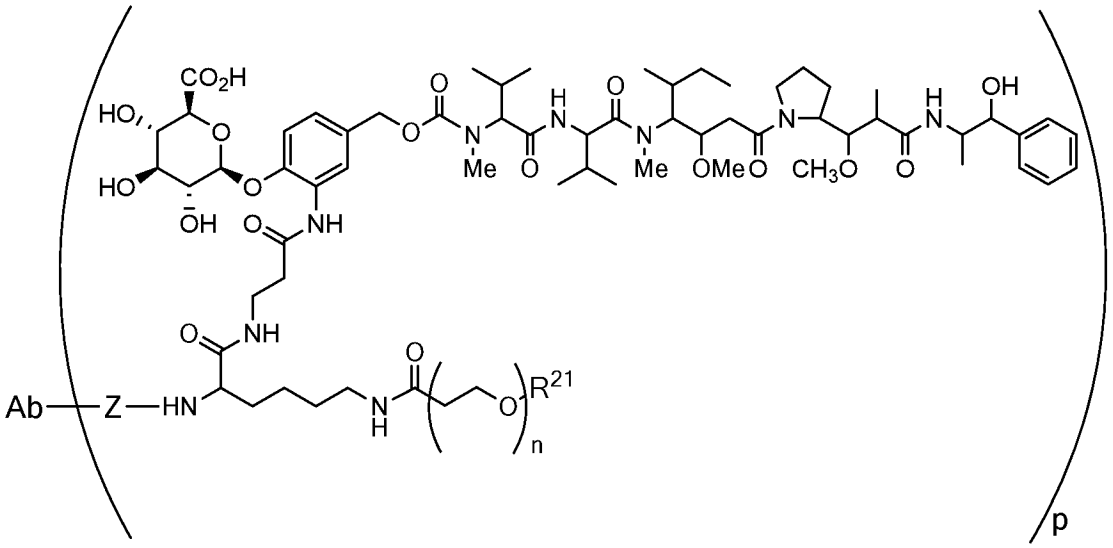
важным показателем качества, поскольку оно определяет количество лекарственного средства, которое может доставляться в клетку-мишень. Процентное содержание неконъюгированных молекул антитела в композиции включено в среднее значение лекарственной нагрузки.

[0092] В предпочтительных аспектах настоящего изобретения средняя лекарственная нагрузка, в отношении композиции, содержащей популяцию соединений конъюгатов антитела-лекарственного средства, составляет от 1 до около 16, предпочтительно от около 2 до около 14, предпочтительнее от около 2 до около 10. Для PBD-конъюгатов антитела-лекарственного средства, таких как приведенные в качестве примера в данном документе, особенно предпочтительная средняя лекарственная нагрузка составляет около 2. В некоторых аспектах изобретения фактическая лекарственная нагрузка на молекулы отдельных антител в популяции соединений конъюгатов антитела-лекарственного средства составляет от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2, с преобладающей лекарственной нагрузкой равной 2. В предпочтительных аспектах изобретения средняя лекарственная нагрузка равная 2 достигается посредством методик сайтспецифической конъюгации (например, сконструированными цистеинами, введенными в антитело и содержащимися в положении 239 в соответствии с системой нумерации по индексу EU).

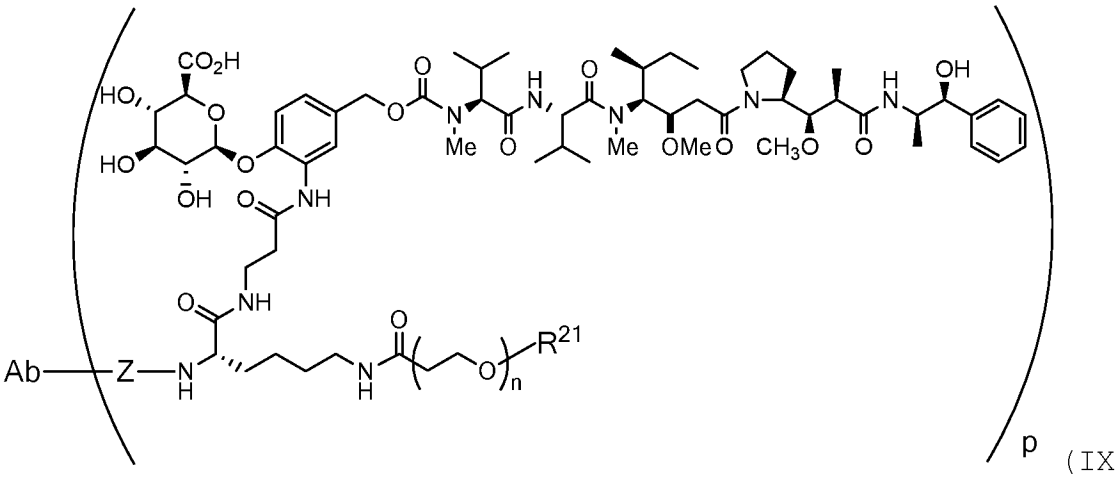
[0093] Для ADC с ПЭГилированными MMAE, таких как приведенные в качестве примера в данном документе, особенно предпочтительная средняя лекарственная нагрузка составляет около 8. В типовых вариантах реализации изобретения лекарственные средства-линкеры конъюгированы с цистеиновыми остатками восстановленными межцепными дисульфидами. В некоторых аспектах изобретения фактическая лекарственная нагрузка на молекулы отдельных антител в популяции соединений конъюгатов антитела-лекарственного средства составляет от 1 до 10 (или от 6 до 10 или от 6 до 8) с преобладающей лекарственной нагрузкой равной 8. Можно достигать более высокой лекарственной нагрузки, например если в добавление к межцепным дисульфидам, лекарственное средство-линкер конъюгировано с введенными цистеиновыми остатками (такими как цистеиновый остаток, введенный в положение

239, в соответствии с индексом EU).

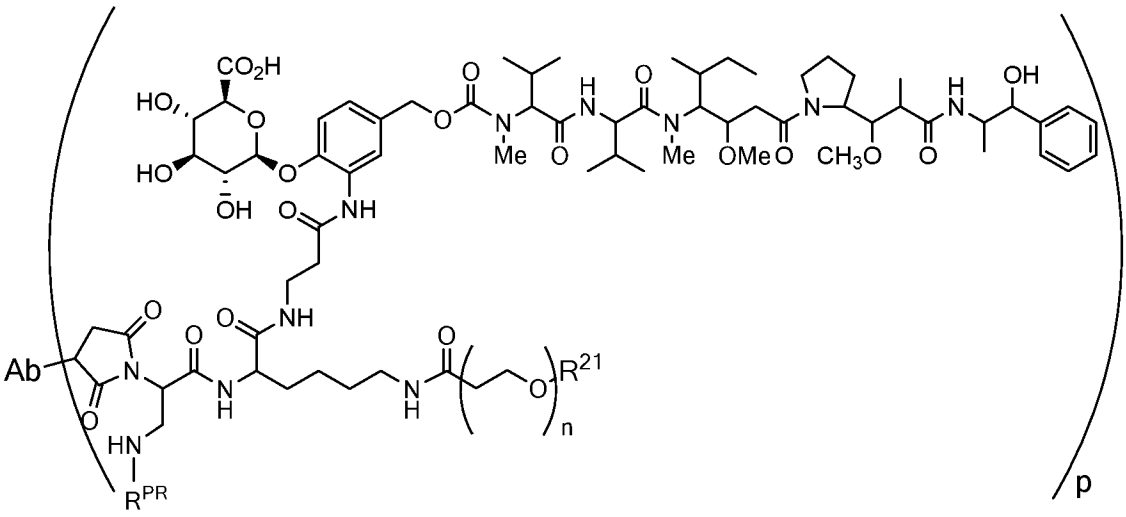
[0094] Типовые ADC включают следующие элементы:



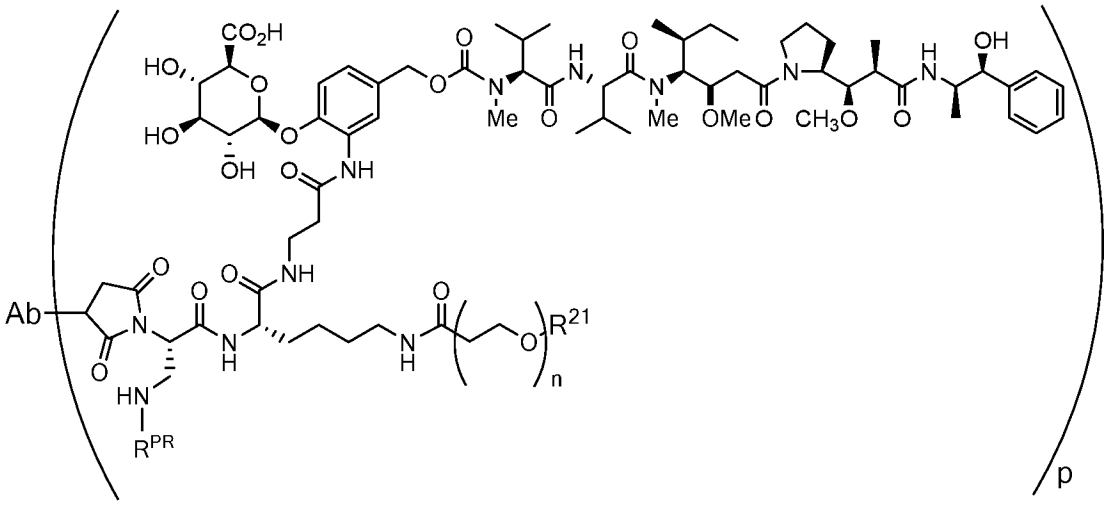
(IX)



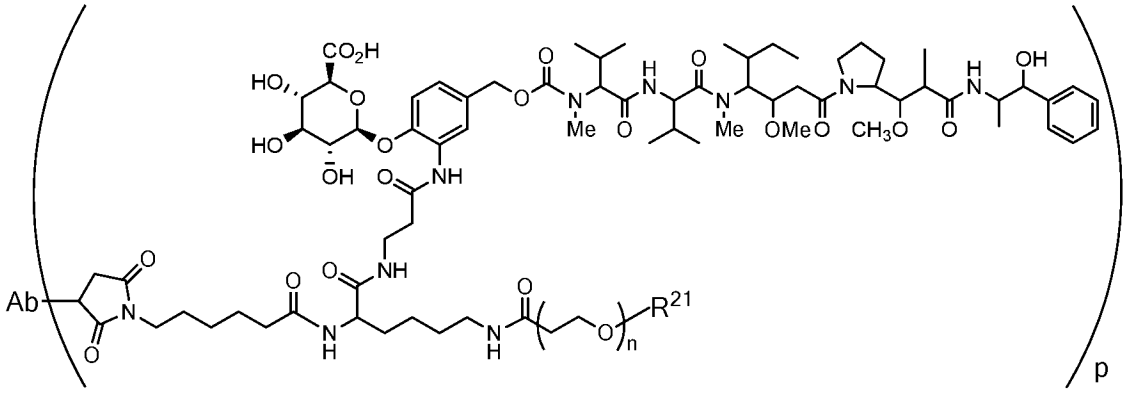
(IXa)



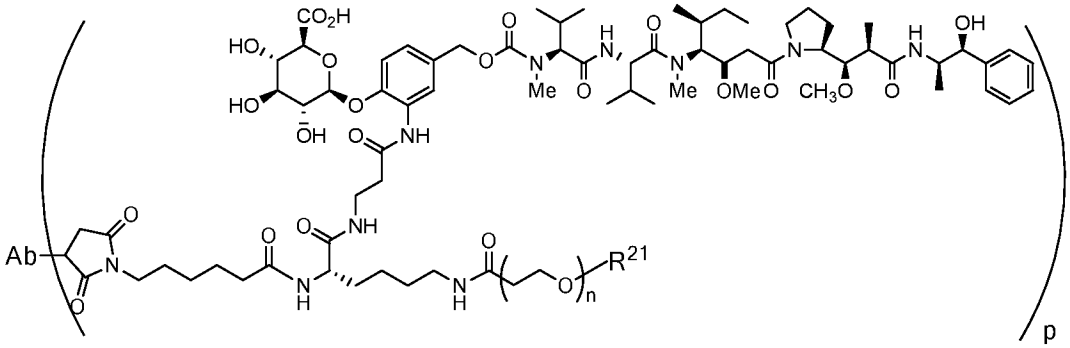
(X)



(Xa)



(XI)



(XIa)

или их фармацевтически приемлемую соль, где n находится в диапазоне от 8 до 36, а наиболее предпочтительно находится в диапазоне от 8 до 14 (наиболее предпочтительно 12), R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, например, кислотолабильную защитную группу, например BOC, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля, предпочтительно $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$, Ab представляет анти-CD48 антитело, а p представляет целое число в диапазоне от 1 до 16, предпочтительно от 1 до 14, от 6 до 12, от 6 до 10 или от 8 до 10, при упоминании отдельных молекул антитела, или средняя лекарственная нагрузка составляет от около 4 или до около 6 до

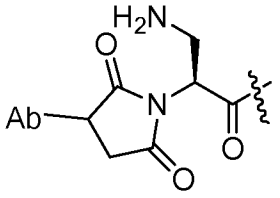
около 14, предпочтительно около 8 при упоминании популяции молекул антитела.

[0095] Как отмечено выше, часть ПЭГ (полиэтиленгликоль) лекарственного средства и линкера может находится в диапазоне от 8 до 36, однако, было обнаружено, что ПЭГ из 12 единиц этиленоксида является особенно предпочтительным. Было обнаружено, что более длинные цепи ПЭГ могут приводить к более медленному выведению, тогда как более короткие цепи ПЭГ могут приводить к пониженной активности. Соответственно, нижний индекс n во всех из вариантов реализации изобретения выше предпочтительно составляет от 8 до 14, от 8 до 12, от 10 до 12 или от 10 до 14 и наиболее предпочтительно - 12.

[0096] Полидисперсные ПЭГ, монодисперсные ПЭГ и дискретные ПЭГ могут использоваться для создания ПЭГилированных конъюгатов антитела и лекарственного средства по данному изобретению. Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГ, как правило, очищены от гетерогенных смесей и поэтому обеспечивают одну длину и молекулярную массу цепи. Предпочтительные единицы ПЭГ представляют собой дискретные ПЭГ - соединения, которые синтезируются поэтапным способом, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные ПЭГ представляют одну молекулу с определенной и установленной длиной цепи. Как с нижним индексом «p» при упоминании популяций конъюгатов антитело-лекарственное средство, значение для нижнего индекса «n» может быть средним значением и может быть либо целочисленным, либо нецелочисленным значением.

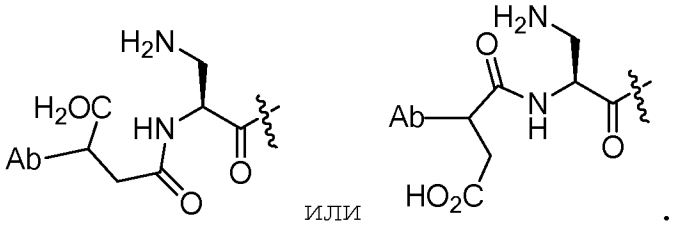
[0097] В предпочтительных вариантах реализации изобретения ковалентное присоединение антитела к лекарственному средству-линкеру выполняется посредством сульфгидрильной функциональной группы антитела, взаимодействующей с малеимидной функциональной группой линкера лекарственного средства с образованием тиозамещенного сукцинимида. Сульфгидрильная функциональная группа может быть представлена на лигандной единице в естественном состоянии лиганда, например, в остатке природного происхождения (межцепочные дисульфидные остатки), или может быть

введена в лиганд посредством химической модификации или путем биологической инженерии, или комбинацией этих обоих способов. Будет понятно, что антитело с замещенным сукцинимидом может существовать в гидролизированной (-ых) форме (-ах). Например, в предпочтительных вариантах реализации изобретения ADC состоит из сукцинимидного фрагмента, который при связывании с антителом, представлен структурой из



,

или состоит из соответствующего ему кислотно-амидного фрагмента, который при связывании с антителом, представлен структурой из:



.

Волнистые линии указывают связь с остальным лекарственным средством-линкером.

Терапевтические применения

[0098] Нацеленный на CD48 конъюгат антитела-лекарственного средства, описанный в данном документе, можно применять для лечения экспрессирующего CD48 нарушения, такого как экспрессирующее CD48 раковое заболевание. Как правило, такие раковые заболевания показывают детектируемые уровни измеренного CD48 по уровню белка (например иммуноанализом) или РНК. Некоторые такие раковые заболевания показывают повышенные уровни CD48 относительно нераковой ткани такого же типа, предпочтительно от того же пациента. Необязательно уровень CD48 в раковой опухоли измеряется перед проведением лечения.

[0099] Примеры раковых заболеваний, связанных с экспрессией CD48, включают множественную миелому и другие В-клеточные неоплазии, включая заболевание Ходжкина, неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому, хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL),

мантийноклеточную лимфому, макроглобулинемию Валденстрема, первичный/системный амилоидоз опухолевых клеток пациента, MGUS и амилоидоз. Наблюдали, что некоторые линии клеток острой миелоцитарной лейкемии (AML) (например, лейкемические бластные клетки пациента с AML) экспрессируют CD48 и, поэтому, пациенты с раковыми заболеваниями AML, которые экспрессируют CD48, можно лечить с использованием описанных ADC против CD48.

[0100] Способы по данному изобретению включают лечение пациента, который болеет раковым заболеванием с экспрессией CD48, включая введение пациенту конъюгата антитело-лекарственное средство по данному изобретению. Раковое заболевание может быть любым экспрессирующим CD48 раковым заболеванием, включая, например, множественную миелому.

[0101] Направленные на CD48 конъюгаты антитела-лекарственного средства вводят в дозировке, подразумевающей эффективную схему, с путем введения и частотой введения, которые замедляют проявление, снижают тяжесть, подавляют дальнейшее ухудшение состояния и/или облегчают по меньшей мере один признак или симптом ракового состояния.

[0102] Типовые дозировки для направленных на CD48 конъюгатов с пэгилированным MMAE обычно составляют от около 1,0 мкг/кг до 10,0 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до 5,0 мг/кг или от около 0,5 мг/кг до 1,0, 2,0 или 4,0 мкг/кг, хотя подразумеваются и альтернативные дозировки. Предпочтительный диапазон доз составляет от около 0,3 мг/кг до около 2,0 мг/кг.

[0103] Введение может проводится различными путями введения. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты вводят парентерально, например, внутривенно, внутримышечно или подкожно. Для введения ADC для лечения рака доставка может проводится в системное кровообращение путем внутривенного или подкожного введения. В конкретном варианте реализации изобретения введение происходит посредством внутривенной доставки. Внутривенное введение может происходит, например, путем инфузии в течении такого периода как 30-90 минут или путем однократной болюсной инъекции. В некоторых аспектах изобретения введение будет проходить посредством в/в вливания (т. е. в

течение 30-60 секунд) в периферически вставленный центральный катетер.

[0104] Частота введения зависит от многих различных факторов, включая средства введения, целевой сайт, физиологическое состояние пациента, пациент является человеком или животным и других вводимых лекарственных препаратов. Частота может быть ежедневной, ежемесячной или через нерегулярные интервалы в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование излечиваемого ракового заболевания. Типовая частота для внутривенного введения находится между двух раз в неделю и четырехкратно в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое дозирование. Другие типовые частоты для внутривенного введения составляют каждые три недели и между одним разом в неделю или одним разом в месяц в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое дозирование. Другая типовая частота представляет собой введение каждые шесть недель. Для подкожного введения типовая частота дозирования составляет от ежедневной до ежемесячной, хотя также возможно более или менее частое дозирование.

[0105] Фармацевтические композиции для исходного введения предпочтительно являются стерильными и практически изотоничными, и произведенные в условиях соответствия GMP. Фармацевтические композиции могут поставляться в единичной лекарственной форме (т. е. дозировка для однократного введения). Фармацевтические композиции могут составляться с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, наполнителей или вспомогательных веществ. Состав может зависеть от выбранного пути введения. Для инъекции конъюгаты могут быть приготовлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферных растворах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор или ацетатный буферный раствор (для снижения неприятных ощущений в месте инъекции). Раствор может содержать такие составляющие вещества, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В альтернативном варианте антитела могут быть в лиофилизированной

форме для растворения перед использованием подходящим носителем, например стерильной апирогенной водой. Концентрация конъюгата в жидкой лекарственной форме может варьировать в широких пределах. В некоторых аспектах изобретения ADC присутствует в концентрации от около 0,5 мг/мл до около 30 мг/мл, от около 0,5 мг/мл до около 10 мг/мл, от около 1 мг/мл до около 10 мг/мл, от около 2 мг/мл до около 10 мг/мл или от около 2 мг/мл до около 5 мг/мл.

[0106] Лечение конъюгатами по данному изобретению можно комбинировать с химиотерапией, радиацией, лечением стволовыми клетками, хирургическим вмешательством и другими видами лечения, эффективными против излечиваемого нарушения, включая стандартный уход за конкретным излечиваемым нарушением. Соответственно, настоящее изобретение охватывает способы лечения заболевания и нарушений, описанных в данном документе, в виде монотерапии или в комбинированной терапии, например, со стандартом ухода или с исследуемыми лекарственными средствами для лечения таких заболеваний и/или нарушений. Способы для лечения ракового заболевания включают введение пациенту, нуждающемуся в нем, эффективного количества направленного на CD48 конъюгата антитела-лекарственного средства настоящего изобретения в комбинации с дополнительным противораковым средством или другим средством для лечения ракового заболевания.

[0107] Типовое средство для комбинированной терапии представляет собой карфилзомиб (например KYPROLIS®) - протеасомный ингибитор, используемый для лечения множественной миеломы (*см.* Siegel DS et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2012; 120:2817-2825). Карфилзомиб можно вводить в виде внутривенной (в/в) инфузии. В одном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном

варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0108] Карфилзомиб также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Карфилзомиб комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Например, карфилзомиб комбинировали с леналидомидом и дексаметазоном (*см.* Stewart KA et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015; 372:142-152). В одном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0109] Карфилзомиб также комбинировали с дексаметазоном (*см.* Dimopoulos MD et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncology* 2016; 17:27-38). В одном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному

изобретению.

[0110] Карфилзомиб также комбинировали с панобиностатом (*см.* Berdeja JG et al. Phase I/II study of the combination of panobinostat and carfilzomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2015; 100:670-676). В одном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

Карфилзомиб комбинировали с помалидомидом и дексаметазоном (*см.* Shah J et al. Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood 2015; 126: 2284-2290). В одном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с помалидомидом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с помалидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с помалидомидом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0111] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой даратумумаб (например DARZALEX™) - моноклональное антитело человека, которое связывает CD38 (гликопротеин, на высоком уровне экспрессируемый на клетках множественной миеломы). Даратумумаб можно вводить пациентам путем внутривенной инфузии для лечения множественной миеломы (*см.* Lokhorst HM et al. Targeting CD38 with daratumumab

monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:1207-1219). В одном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0112] Даратумумаб также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Даратумумаб комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Например, даратумумаб комбинировали с бортезомибом и леналидомидом (*см.* Phipps C et al. Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. *Ther Adv Hematol* 2015; 6:120-127). В одном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, леналидомидом и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, леналидомидом и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, леналидомидом и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0113] Даратумумаб также комбинировали с бортезомибом и декаметазоном (*см.* Phipps C et al.). В одном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения даратумумаб

вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[114] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой элотузумаб (например EMPLICITI™) - моноклональное антитело человека, которое связывает CD319 или сигнальную молекулу лимфоцитарной активации F7 (SLAMF7), маркер злокачественных клеток множественной миеломы). Элотузумаб можно вводить пациентам путем внутривенной инфузии для лечения множественной миеломы (*см.* Zonder JA et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 552-559)). В одном варианте реализации изобретения элотузумаб вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения элотузумаб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения элотузумаб вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0115] Элотузумаб также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Элотузумаб комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Например, элотузумаб комбинировали с леналидомидом и дексаметазоном (*см.* Lonial S et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:621-631). В одном варианте реализации изобретения элотузумаб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации

изобретения элотузумаб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения элотузумаб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0116] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой леналидомид (например REVLIMID®) - иммуномодулирующее средство, даваемое пациентам для лечения множественной миеломы (*см.* Richardson PG, A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2006, 108: 3458-3464). Леналидомид может быть упакован в виде капсулы, пилюли или таблетки для перорального введения. В одном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0117] Леналидомид также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Леналидомид комбинировали с различными дополнительными средствами, которые лечат множественную миелому. Например, леналидомид комбинировали с бортезомидом и дексаметазоном (*см.* Richardson PG et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2010; 116:679-686). В одном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и

направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0118] Леналидомид также комбинировали с карфилзомибом и дексаметазоном (*см.* Stewart KA et al.). В одном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[119] Леналидомид также комбинировали с даратумумабом и бортезомибом (*см.* Phipps C et al.). В одном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, бортезомибом и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, бортезомибом и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, бортезомибом и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0120] Леналидомид также комбинировали с элотузумабом и дексаметазоном (*см.* Lonial S et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;

373:621-631). В одном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с элотузумабом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с элотузумабом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения леналидомид вводят в комбинированной терапии с элотузумабом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0121] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой бортезомиб (например VELCADE®) - протеасомный ингибитор, даваемый пациентам для лечения множественной миеломы и мантийноклеточной миеломы (*см.* Richardson PG, A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-2617). Бортезомиб можно вводить пациентам посредством внутривенной инъекции. В одном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0122] Бортезомиб также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Бортезомиб комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Например, бортезомиб комбинировали с талидомидом и дексаметазоном (*см.* Kapoor P et al. Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin Hematol* 2012; 3:228-242). В одном варианте

реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с талидомидом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с талидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с талидомидом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

Бортезомиб также комбинировали с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом и этопозидом (*см.* Kapoor P et al.). В одном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0123] Бортезомиб также комбинировали с даратумумабом и леналидомидом (*см.* Phipps C et al.). В одном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, леналидомидом и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, леналидомидом и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с даратумумабом,

леналидомидом и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0124] Бортезомиб также комбинировали с леналидомидом и дексаметазоном (*см.* Richardson PG et al. 2010). В одном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0125] Бортезомиб также комбинировали с панобиностатом и дексаметазоном (*см.* Richardson P et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. Blood 2013; 122:2331-2337). В одном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения бортезомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0126] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой дексаметазон (например DECADRON®) - глюкокортикостероид, используемый для лечения ракового заболевания (включающего множественную миелому, лейкемию и лимфому), воспаления, аллергий и тошноты. Дексаметазон можно вводить в виде таблетки, пилюли или капсулы для перорального

введения, или внутривенной инфузией. В одном варианте реализации изобретения дексаметазон вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения дексаметазон вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения дексаметазон вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению. Дексаметазон также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством.

[0127] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой циклофосфамид (например CYTOXAN®) - алкилирующее средство, используемое для лечения ракового заболевания (включающего среди прочих множественную миелому, острую миелоцитарную лейкемию, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, рак молочной железы и рак легкого). Циклофосфамид можно вводить путем инъекции, инфузии, в виде таблетки, пилюли или капсулы для перорального введения, или инъекцией в мышцу, в брюшную полость или в полость легкого. В одном варианте реализации изобретения циклофосфамид вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения циклофосфамид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения циклофосфамид вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению. Циклофосфамид также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством.

[0128] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой мелфалан, алкилирующее средство, используемое

для лечения ракового заболевания (включающего множественную миелому и рак яичника). Мелфалан можно вводить перорально, в виде инъекции или инфузии. В одном варианте реализации изобретения мелфалан вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения мелфалан вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения мелфалан вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0129] Мелфалан также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством.

[0130] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой помалидомид (например POMALYST®) - иммуномодулирующее средство, используемое для лечения множественной миеломы. Помалидомид можно вводить в виде капсулы, пилюли или таблетки для перорального введения. В одном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0131] Помалидомид также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Помалидомид комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Помалидомид комбинировали с дексаметазоном (*см.* Richardson P et

al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. Blood 2014; 123:1826-1832). В одном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0132] Помалидомид комбинировали с карфилзомибом и дексаметазоном (*см.* Shah J et al. Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood 2015; 126: 2284-2290). В одном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения помалидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0133] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой панобиностат (например FARYDAK®) - ингибитор гистоновой деацетилазы (HDAC), используемый для лечения ракового заболевания (включающего множественную миелому) (*см.* Wolf JL et al. A phase II study of oral panobinostat (LBH589) in adult patients with advanced refractory multiple myeloma. ASH Annual Meeting Abstracts, 2008). Панобиностат можно вводить в виде пилюли, капсулы или таблетки для перорального введения. В одном

варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0134] Панобиностат также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Панобиностат комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Например, панобиностат комбинировали с карфилзомибом (*см.* Berdeja JG et al.). В одном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

Панобиностат также комбинировали с бортезомибом и декаметазоном (*см.* Richardson P et al. 2013). В одном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения панобиностат вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-

gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0135] Другое типовое средство для комбинированной терапии представляет собой иксазомиб (NINLARO®) - протеасомный ингибитор, используемый для лечения ракового заболевания (включающего множественную миелому). Иксазомиб можно вводить перорально. В одном варианте реализации изобретения иксазомиб вводят в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения иксазомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения иксазомиб вводят в комбинированной терапии с hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

Иксазомиб также можно вводить в комбинированной терапии с направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению и дополнительным средством. Иксазомиб комбинировали с различными дополнительными средствами для лечения множественной миеломы. Например, иксазомиб комбинировали с леналидомидом и дексаметазоном (*см.* Moreau P et al. Ixazomib, an investigational oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone, significantly extends progression-free survival for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma: the phase 3 tourmaline-MM1 study. ASH Annual Meeting Abstracts, 2015). В одном варианте реализации изобретения иксазомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и направленным на CD48 конъюгатом антитела-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения иксазомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела hMEM102-лекарственного средства по данному изобретению. В дополнительном варианте реализации изобретения иксазомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE с 8-кратной нагрузкой по данному изобретению.

[0136] Любой признак, этап, элемент, вариант реализации или аспект по данному изобретению может использоваться в сочетании с любым другим, если только конкретно не указано иное. Хотя, для ясности понимания, вышеизложенное изобретение было подробно описано посредством иллюстраций и примеров, очевидно, что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения могут быть осуществлены на практике некоторые изменения и модификации.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предложены для иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1. Выбор и гуманизация антитела.

[0137] Сначала было описано мышиное антитело MEM102, связывающееся с белком CD48 человека, в Bazil et al., *Folia Biologica* 35:289-297 (1989). Были идентифицированы нуклеиновые кислоты, кодирующие мышиное антитело MEM102, их секвенировали и они кодировали последовательности CDR тяжелой и легкой цепи, т. е. SEQ ID NO:3-8. Некоторые гуманизированные антитела MEM102 конструировали с использованием вариабельного участка тяжелой цепи hIgG VH7-4-1/hIgG-JH5 зародышевой линии человека и вариабельного участка легкой цепи hIgG-VK6-21/hIgG-JK4 зародышевой линии человека в качестве человеческих акцепторных последовательностей. Антитела, отличавшиеся по выбору аминокислотных остатков, подвергали обратной мутации до последовательности антитела мыши или зародышевой линии мыши. Антитело, обозначенное HALA (тяжелая цепь, указанная в SEQ ID NO:1 (vHA) и легкая цепь, указанная в SEQ I D NO:2 (vLA)), выбрали как главное гуманизированное антитело MEM102 по сравнению с другими вариантами на основе его: (i) характеристик связывания, (ii) способности доставлять лекарственное средство и (iii) количества обратных мутаций. Гуманизированное антитело MEM102 также называют hMEM102.

[0138] Вместо антитела HALA в настоящем изобретении можно использовать антитело, обозначенное HCLA (антитело с вариабельным участком тяжелой цепи, обозначенным vHC, и вариабельным участком легкой цепи, обозначенным vLA), HALB (антитело с вариабельным участком тяжелой цепи, обозначенным

vHA, и вариабельным участком легкой цепи, обозначенным vLB), HBLA (антитело с вариабельным участком тяжелой цепи, обозначенным vHB, и вариабельным участком легкой цепи, обозначенным vLA), HBLB (антитело с вариабельным участком тяжелой цепи, обозначенным vHB, и вариабельным участком легкой цепи, обозначенным vLB), HCLB (антитело с вариабельным участком тяжелой цепи, обозначенным vHC, и вариабельным участком легкой цепи, обозначенным vLB). См. Фиг. 1 и 2 касательно последовательностей vHA, vHB, vHC, vLA, vLB и vLC. Аффинности связывания для различных гуманизированных форм MEM102 являются сходными при исследовании их против клеток, сверхэкспрессирующих как CD48 человека, так и яванского макака.

Пример 2. Характеристика связывания hMEM102.

[0139] Методы исследования. Для определения насыщения связывания анти-CD48 антитела опухолевые клетки U-266 множественной миеломы человека или стабильно трансфецированные CD48 яванского макака клонированные клетки CHO-DG44 окрашивали титрованными антителами (0,8 нг/мл - 50 мкг/мл), конъюгированными с Alexa Fluor-647, нагруженными приблизительно 2-4 флуорофорами на антитело. После одного часа инкубации на льду, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствор, содержащим 2% фетальной бычьей сыворотки и 0,02% азида натрия. Флуоресценцию выявляли на проточном цитометре LSRII и определяли значения Kd с использованием нелинейной регрессии с одним сайтом связывания (гипербола) в программе GraphPad Prism.

[0140] Результаты. В табл. 1 и на Фиг. 3 и 4 показано, что антитело hMEM102-HALA обладает сходной аффинностью связывания по сравнению с cMEM102 в клетках U-266, как отмечено низкими значениями Kd. Аффинность связывания hMEM102-HALA и cMEM102 с CD48 яванского макака в стабильно трансфецированных клонированных клетках CHO-DG44 также была сравнимая. В обоих линиях клеток как hMEM102-HALA, так и cMEM102 обладали более чем в 4 раза меньшим значением Kd по сравнению с mMEM102. Анти-CD48 антитела обладали приблизительно в 6 раза более сильной аффинностью связывания с CD48 человека по сравнению с CD48 яванского макака.

Таблица 1.

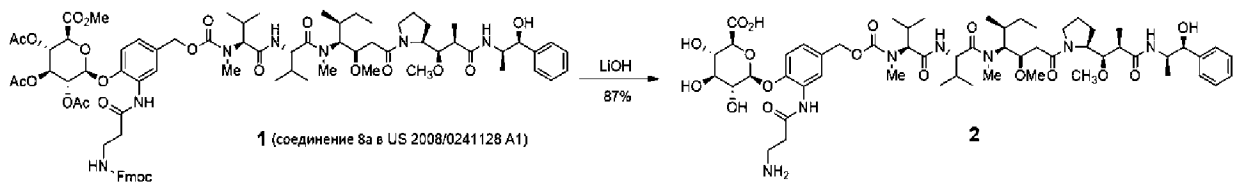
		Kd (нМ)	
Антитело	**№ серии**	**U-266**	**CHO-DG44-CD48 яванского макака**
hMEM102-HALA	9915029F	5,0	31,1
cMEM102	7713039A	5,8	40,5
mMEM102	275036T	20,8	164,7

Пример 3. Синтез MDpr-PEG(12)-glyc-MMAE и конъюгация с hMEM102.

[0141]Общая информация. Все коммерчески доступные безводные растворители использовали без дополнительной очистки. Реактивы ПЭГ получали от компании Quanta BioDesign (г. Пауэлл, штат Огайо). Аналитическую тонкослойную хроматографию выполняли на силикагеле 60 F254 на алюминиевой фольге (EMD Chemicals, г. Гибстаун, штат Нью-Джерси). Радиальную хроматографию выполняли на аппарате Chromatotron (Harris Research, г. Пало-Альто, штат Калифорния). Колоночную хроматографию выполняли на системе Biotage Isolera One с флэш-очисткой (г. Шарлотт, штат Северная Каролина). Аналитическую ВЭЖХ выполняли на системе Varian ProStar 210 с подачей растворителей, сконфигурированной с PDA-детектором Varian ProStar 330. Образцы элюировали через обращенно-фазную колонку C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 мкм, 80 Å. Подкисленная подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды, которые содержали либо 0,05% трифторуксусной кислоты, либо 0,1% муравьиной кислоты (отмечено для каждого соединения). Соединения элюировали линейным градиентом подкисленного ацетонитрила от 5% на 1 мин после введения до 95% на 11 мин с последующим изократическим элюированием 95% ацетонитрилом до 15 мин (скорость потока=1,0 мл/мин). Анализ ЖХ-МС выполняли на двух различных системах. Система 1 для ЖХ-МС состояла из масс-спектрометра ZMD Micromass, подключенного к прибору для ВЭЖХ HP Agilent 1100, оборудованному обращенно-фазной колонкой C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 мкм, 80 Å. Подкисленный элюент состоял из линейного градиента ацетонитрила от 5% на 95% в 0,1%

водной муравьиной кислоте в течение 10 мин с последующим изократическим элюированием 95% ацетонитрилом в течение 5 мин (скорость потока=0,4 мл/мин). Система 2 для ЖХ-МС состояла из масс-спектрометра Waters Xevo G2 с Tof, подключенного к модулю для разделений Waters 2695 с фотодиодным матричным детектором Waters 2996; колонка, подвижная фаза, градиент и скорость потока были аналогичными как для системы 1. Анализ СВЭЖХ-МС проводили на масс-детекторе Waters SQ, подключенном к сверхвысокоэффективной системе ЖХ Acquity, оборудованной обращенно-фазной колонке Acquity UPLC BEH C18 2,1×50 мм, 1,7 мкм. Подкисленная подвижная фаза (0,1% муравьиной кислоты) состояла из градиента 3% ацетонитрила/97% воды до 100% ацетонитрила (скорость потока=0,5 мл/мин). Препаративную ВЭЖХ проводили на системе Varian ProStar 210 с подачей растворителей, сконфигурированной с PDA-детектором Varian ProStar 330. Продукты очищали на обращенно-фазной колонке C12 Phenomenex Synergi 10,0×250 мм, 4 мкм, 80 Å, элюированием с помощью 0,1% муравьиной кислоты в воде (растворитель A) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель B). Метод очистки состоял из следующего градиента растворителя A и растворителя B: 90:10 от 0 до 5 мин; 90:10 до 10:90 от 5 мин до 80 мин; с последующим изократическим элюированием 10:90 в течение 5 мин. Скорость потока составляла 4,6 мл/мин с мониторингом при 254 нм. Препаративную ВЭЖХ для соединений в схемах 3 и 4 вместо 0,1% муравьиной кислоты проводили с 0,1% трифторуксусной кислотой в обеих подвижных фазах.

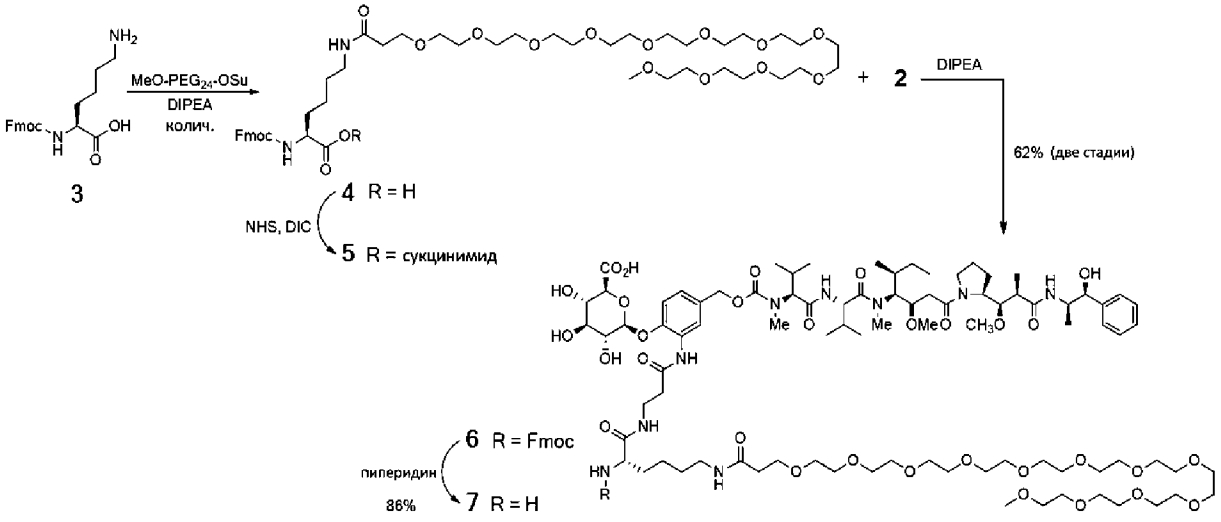
Схема 1.



[0142] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-аминопропанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксипропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-

4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (2). В колбу, содержащую известный интермедиат 2 глюкуронид-ММАЕ (соединение 8a в US 2008/0241128 A1) (40 мг, 26,8 мкмоль) добавляли 0,9 мл метанола и 0,9 мл тетрагидрофурана. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и по каплям добавляли моногидрат гидроксида лития (6,8 мг, 161 мкмоль) в виде раствора в 0,9 мл воды. Затем реакционную смесь перемешивали на льду в течение 1,5 ч, за это время анализом ЖХ/МС выявлено полное превращение в продукт. Затем добавляли ледяную уксусную кислоту (9,2 мкл, 161 мкмоль) и реакционную смесь упаривали до сухого состояния. Препаративная ВЭЖХ дала возможность выделить полностью незащищенный линкерный интермедиат 3 глюкуронида-ММАЕ (26 мг, 87%) в виде маслянистого остатка. Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиная кислота): t_R 9,3 мин. Система 1 для ЖХ-МС: t_R 11,10 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 1130,48 $(M+H)^+$, обнаруженный *m/z* (ES^-) 1128,63 $(M-H)^-$.

Схема 2.



[0143] (S)-44-(((((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азапентатетраконтан-45-оиловая кислота (4). В колбу, содержащую N_α-Fmoc-лизин 3 (59 мг, 161 мкмоль) добавляли 2,9 мл безводного дихлорметана с последующим добавлением метокси-ПЭГ12-OSu (100 мг, 146 мкмоль). Затем добавляли DIPEA (127 мкл, 730 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали под азотом при комнатной

температуре с последующим проведением ТСХ и ХЖ/МС. Через 2 ч анализом ХЖ/МС выявляли превращение в продукт. Реакционный раствор разбавляли в дихлорметане и очищали методом хроматографии на силикагеле. Неподвижную фазу элюировали дихлорметаном с возрастающими количествами метанола (от 0% до 20%) для получения требуемого продукта 4 (153 мг, 112%). СВЭХЖ-МС: t_R 1,77 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 939,58 $(M+H)^+$.

[0144] (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 44-((((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азапентатетраконтан-45-оат (5). Колбу заполняли N_α-Fmoc-лизин (PEG12)-OH 4 (153 мг, 163 мкмоль) и 1,6 мл безводного гидрофурана. Добавляли N-гидроксисукцинимид (28 мг, 245 мкмоль) с последующим добавлением диизопропилкарбодиимида (38 мкл, 245 мкмоль). Реакционную смесь изолировали под азотом и перемешивали в течение ночи. Неочищенную реакционную смесь разбавляли в дихлорметане с возрастающими количествами метанола (от 0% до 10%) для получения требуемого активированного сложного эфира 5 (155 мг). Вещество использовали без дополнительного определения характеристик. СВЭХЖ-МС: t_R 1,92 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 1036,48 $(M+H)^+$.

[0145] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-диазанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (6). Незащищенный линкерный интермедиат 2 глюкуронида-ММАЕ (92 мг, 81 мкмоль) растворяли в безводном диметилформамиде (1,6 мл) и добавляли в колбу, содержащую Nα-Fmoc-лизин (PEG12)-OSu 5 (101 мг, 97 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (70 мкл, 405 мкмоль), потом реакционную

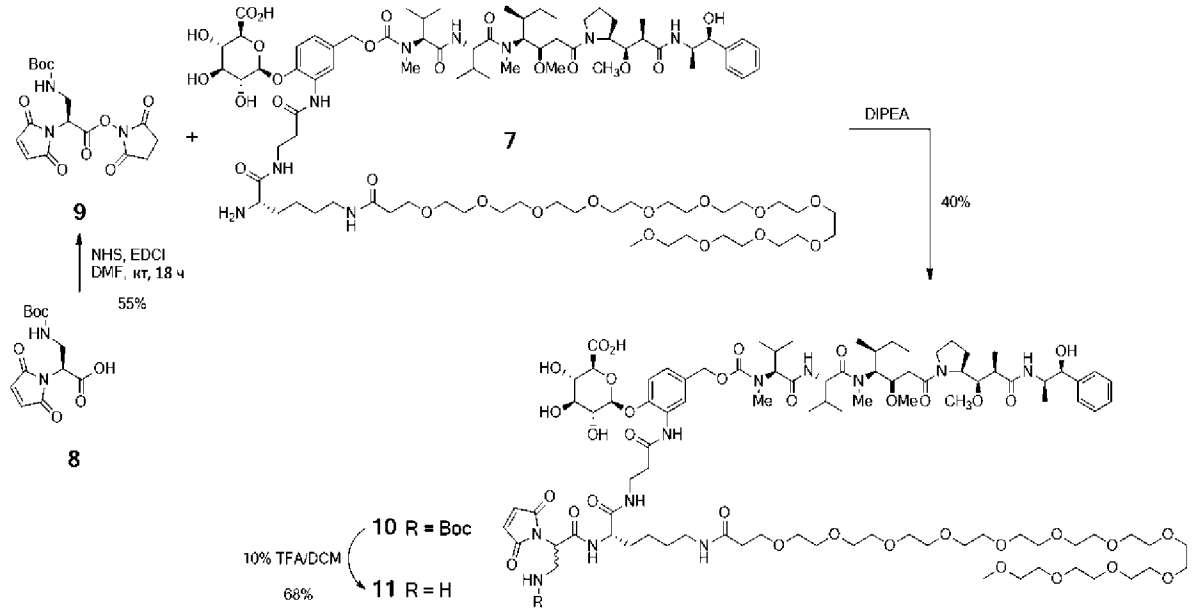
смесь перемешивали под азотом при комнатной температуре. Через 4,5 ч анализом ХЖ/МС выявляли превращение в продукт. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ для получения интермедиата 6 Fmoc-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (111 мг, 62% за две стадии) в виде маслянистого остатка. СВЭХЖ-МС: t_R 2,01 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 2050,92 $(M+H)^+$.

[0146] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-амино-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-диазанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (7). Растворяли интермедиат 6 Fmoc-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (111 мг, 54 мкмоль) в 2,2 мл безводного диметилформамида с последующим добавлением 0,5 мл пиперидина. Реакционную смесь перемешивали под азотом в течение 3 часов и затем упаривали до сухого состояния. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ для получения интермедиата 7 H-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (85 мг, 86%) в виде маслянистого остатка. СВЭХЖ-МС: t_R 1,50 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 1829,31 $(M+H)^+$.

[0147] (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноат (9). Растворяли (S)-N_α-малеимидо-N_β-Boc-диаминопропановую кислоту **8** (*Nature Biotechnology*, **2014**, *32*, 1059-1062) (400 мг, 1,4 ммоль) в 7 мл безводного диметилформамида. Добавляли N-гидроксисукцинимид (178 мг, 1,5 ммоль) с последующим добавлением 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (298 мг, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре под азотом в течение 3 часов. Водную обработку выполняли посредством разбавления в 120 мл воды; затем водный слой экстрагировали три раза с помощью 60 мл этилацетата. Затем объединенный органический слой промывали соляным раствором, высушивали над

сульфатом натрия и упаривали до сухого состояния. Очищали продукт флэш-колоночной хроматографией, элюируя смесями из гексана:этилацетата (50:50 до 0:100) для получения сложного эфира NHS и (S)-N_α-малеимидо-N_β-Boc-диаминопропановой кислоты [MDpr(Boc)-OSu] **9** (297 мг, 55%). Система 1 ХЖ-МС: t_R 12,23 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 282,0599 $(M+H\text{-Boc группа})^+$. Система 2 ХЖ-МС: t_R 11,30 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 2580,2515 $(M+H)^+$.

Схема 3.



[0148] (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((S)-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-диазанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (10). MDpr(Boc)-OSu 9 (20 мг, 53 мкмоль) растворяли в 2,2 мл безводного диметилформамида и добавляли в колбу, содержащую линкерный интермедиат 7 H-Lys(PEG12)-глюкуронид-MMAE (86 мг, 44 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (15 мкл, 88 мкмоль), потом реакционную смесь перемешивали под азотом при комнатной температуре в течение 2,5

ч. Реакцию останавливали с помощью 15 мкл ледяной уксусной кислоты и очищали препаративной ВЭЖХ для возможности получения интермедиата 10 MDpr(Boc)-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (37 мг, 40%) в виде смеси диастереоизомеров. Диастереоизомеры разделяли методом хиральной хроматографии. СВЭХЖ-МС: t_R 1,84 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 2095,44 $(M+H)^+$.

[0149] (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-диазанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-втор-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (11). Колбу, содержащую интермедиат 10 MDpr(Boc)-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (34 мг, 16 мкмоль), охлаждали до 0 °C на ледяной бане под азотом. По каплям добавляли раствор 10% трифторуксусной кислоты в дихлорметане (0,8 мл). Затем реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 2 ч, за это время анализом ЖХ/МС выявлено полную потерю Boc-защиты. Затем реакционную смесь упаривали до неочищенного остатка и очищали препаративной ВЭЖХ для получения линкера 11 MDpr-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (22 мг, 68%). СВЭХЖ-МС: t_R 1,50 мин, обнаруженный *m/z* (ES^+) 1995,18 $(M+H)^+$.

[0150] Соединение 11 конъюгировали посредством его межцепных тиолов с анти-CD48 антителом при средней лекарственной нагрузке 8 молекул лекарственного средства на антитело с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, патент США № 7659241).

Пример 4. Цитотоксичность ADC hMEM-102 на линиях раковых клеток множественной миеломы.

[0151] Методы исследования. Линии клеток множественной миеломы человека EJM (DSMZ; IMDM +20% FBS), L363 (DSMZ; RPMI 1640 +15% FBS), MM.1R (ATCC; RPMI 1640+10% FBS), NCI-H929 (ATCC:

RPMI 1640+10% FBS), U-266 (ATCC; RPMI 1640 +15% FBS) и LP-1 (DSMZ; IMDM +20% FBS) культивировали при 37 °C, 5% CO_2. Конъюгаты анти-CD48 антитела с лекарственным средством ауристатином серийно 3-кратно разбавляли в среде для получения 10-ти точечных кривых зависимости от дозы (1000 нг/мл - 0,05081 нг/мл) и наносили на клетки множественной миеломы, культивированных в 96-луночных аналитических планшетах (от 10000 до 15000 клеток на лунку в 200 мкл среды). Клетки инкубировали с ADC в течение всего 96 часов при 37 °C, 5% CO2. Анализировали жизнеспособность клеток с использованием люминесцентного анализа цитотоксичности Cell Titer Glo (Promega), а данные собирали с использованием устройства считывания планшетов EnVision (PerkinElmer). Все анализы цитотоксичности выполняли с точками четырехкратного повторения данных, и отмечали средние значения IC50 из 2-3 независимых экспериментов.

[0152] Апоптическую гибель клеток измеряли с использованием анализа Caspase-Glo 3/7 (Promega), используя идентичные условия анализа, описанные выше.

[0153] Результаты. Результаты показаны в табл. 2. Антитело hMEM102 конъюгировали с vcMMAE(4-кратная нагрузка), mcMMAF(4-кратная нагрузка) и MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE, как восьмикратная нагрузка, также называется hMEM102-5088(8). Сходные конъюгации выполняли на контрольном антителе - несвязывающем CD48 антителе. По сравнению с таким же антителом, конъюгированным с vcMMAE(4) и mcMMAF(4), антитело hMEM102-5088(8) проявляло увеличенную цитотоксическую активность. В качестве отрицательного контроля в эксперимент также включена линия клеток, которая не экспрессирует CD48, LP-1.

Таблица 2.

Антитело	**Линкер лекарственного средства**	**Нагрузка лекарственного средства**	**Линии клеток множественной миеломы** (Кол-во CD48-рецепторов/клеток)					
			EJM (135000)	**L363** (460000)	**MM.1R** (336000)	**NCI-H929** (483000)	**U-266** (270000)	**LP-1** (0)

hMEM102	vcMMAE	4	8,7	36	12	13	6,0	>1000
hMEM102	mcMMAF	4	4,0	34	7,0	*Не исследов.*	3,0	>1000
hMEM102	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	2,0	11	2,0	2,5	1,0	>1000
hMEM102	Ауристатин Т	8	1,0	15	1,7	1,5	1,0	>1000
hIgG	vcMMAE	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	mcMMAF	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	Ауристатин Т	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

[0154] Две линии клеток оценивали на апоптическую гибель клеток, NCI-H929 и U-266. Результаты показаны на Фиг. 5 и 6. В обеих линиях клеток конъюгат hMEM102- MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) индуцировал апоптическую гибель клеток после семидесяти часов воздействия данного лекарственного средства. Случаев апоптической гибели не было обнаружено в клетках, обработанных контрольным антителом, конъюгированным с MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8). На этой фигуре на одном антителе конъюгированы линкер лекарственного средства, называемый 5088, и восемь линкеров лекарственного средства. На обеих Фиг. 5 и 6 конъюгат hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) представлен закрашенными квадратами, тогда как конъюгат контрольного антитела-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) представлен незакрашенными квадратами.

Пример 5. Исследования ксенотрансплантатов множественной миеломы in vivo.

[0155] Самкам NSG (NOD scid-гамма; NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) мышей имплантировали внутривенно 2,5 миллионов клеток NCI-H929 на животное для получения диссеминированной модели множественной миеломы. Через пять дней после имплантации опухолевых клеток, n=8 мышам на группу лечения давали однократную внутрибрюшинную инъекцию ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) или несвязывающий контрольный ADC hIgG-MDpr-

PEG(12)-gluc-MMAE (5088), или hMEM102-ауристатин T (4830), или несвязывающий контрольный hIgG-ауристатин T (4830). Исследуемые уровни доз ADC составляли 0,33 мг/кг и 1,0 мг/кг. Мышей с опухолевой нагрузкой на поздней стадии умерщвляли при проявлении симптомов паралича тазовой конечности, отека головного мозга и/или состояния агонии. Как показано на Фиг. 7, оба ADC создавали продолжительные полные ответы у 8/8 мышей на всех уровнях доз (однократная доза), тогда как все мыши, которым вводили дозы несвязывающего контрольного ADC, были умерщвлены из-за заболевания на сутки 60 исследования.

[0156] Самкам NSG (NOD scid-гамма; NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) мышей имплантировали подкожно 1 миллион клеток NCI-H929 множественной миеломы на животное. Когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3, n=7 мышам на группу лечения давали однократную внутрибрюшинную инъекцию ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) или несвязывающий контрольный ADC hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088), или hMEM102-ауристатин T (4830), или ADC hMEM102-vcMMAE (1006), или несвязывающий контрольный hIgG-vcMMAE (1006). Исследуемые уровни доз ADC составляли 0,33 мг/кг и 1,0 мг/кг. Отдельных мышей умерщвляли, когда объем подкожной опухоли NCI-H929 достигал 1000 мм^3. Как показано на Фиг. 8, с помощью ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) получали продолжительные полные ответы у всех мышей при уровнях дозы 1,0 мг/кг. При меньшем уровне дозы 0,33 мг/кг, hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) получали задержку развития опухоли. ADC с vcMMAE и ауристатином T индуцировали задержку развития опухоли только при наибольших дозах.

[0157] Самкам NSG (NOD scid-гамма; NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) мышей имплантировали внутривенно 1 миллион клеток MM.1R на животное для получения диссеминированной модели множественной миеломы. Через пять дней после имплантации опухолевых клеток, n=7 мышам на группу лечения давали однократную внутрибрюшинную инъекцию ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) или несвязывающий контрольный ADC hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088), или hMEM102-ауристатин T (4830), или несвязывающий контрольный hIgG-ауристатин T (4830). Исследуемые уровни доз ADC составляли 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг. Мышей с опухолевой нагрузкой на поздней стадии умерщвляли при проявлении симптомов паралича тазовой конечности, отека головного мозга и/или состояния агонии. Как показано на Фиг. 9, оба ADC

создавали продолжительные полные ответы у мышей на всех исследованных уровнях доз (однократная доза), тогда как у мышей, которым вводили дозы несвязывающего контрольного ADC, все были умерщвлены из-за заболевания на сутки 60 исследования.

[0158] Самкам NSG (NOD scid-гамма; NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) мышей имплантировали подкожно 5 миллионов клеток ММ.1R множественной миеломы на животное. Когда средний объем опухоли достигал 100 мм^3, n=7 мышам на группу лечения давали однократную внутрибрюшинную инъекцию ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) или несвязывающий контрольный ADC hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088), или hMEM102-ауристатин Т (4830), или ADC hMEM102-vcMMAE (1006), или несвязывающий контрольный hIgG-vcMMAE (1006). Исследуемые уровни доз ADC составляли 0,33 мг/кг и 1,0 мг/кг. Отдельных мышей умерщвляли, когда объем подкожной опухоли ММ.1R достигал 1000 мм^3. Как показано на Фиг. 10, с помощью ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) получали наиболее сильный противоопухолевый ответ и самую длительную задержку развития опухоли.

[0159] Самкам NSG (NOD scid-гамма; NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) мышей имплантировали внутривенно 5 миллионов клеток EJM на животное для получения диссеминированной модели множественной миеломы. Через пять дней после имплантации опухолевых клеток, n=8 мышам на группу лечения давали однократную внутрибрюшинную инъекцию ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) или несвязывающий контрольный ADC hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088), или hMEM102-ауристатин Т (4830), или несвязывающий контрольный hIgG-ауристатин Т (4830). Исследуемые уровни доз ADC составляли 0,33 мг/кг и 1,0 мг/кг. Мышей с опухолевой нагрузкой на поздней стадии умерщвляли при проявлении симптомов паралича тазовой конечности, отека головного мозга и/или состояния агонии. Как показано на Фиг. 11, с помощью ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) получали наиболее сильный противоопухолевый ответ, 6/8 полных ответов при 0,33 мг/кг и 7/8 полных ответов при 1,0 мг/кг. Все мыши, которым вводили дозы несвязывающего контрольного ADC, были умерщвлены из-за заболевания на сутки 60 исследования.

Пример 6. Эффекторная функция.

[0160] Методами для клеток-мишеней WIL2-S измеряли антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) посредством высвобождения хрома-51 с использованием очищенных клеток

естественных киллеров (NK) в сочетании с покрытыми антителами CD48-положительными клетками-мишенями. Опухолевые клетки WIL2-S метили хромом-51 и предварительно инкубировали в течение 30 минут с антителами (0,1 нг/мл - 10 мкг/мл). Затем клетки-мишени объединяли с эффекторными клетками NK (соотношение эффекторная клетка/мишень 10:1) и инкубировали дополнительно 4 часа при 37 °C, 5% CO2. Затем в супернатанте количественно определяли хром-51 на устройстве считывания планшетов Perkin Elmer TopCount. Активность АЗКЦ измеряли в виде процента от максимального лизиса относительно обработанных 1% раствором Triton X-100 контрольных клеток-мишеней. АЗКЦ анализировали для нормальных покоящихся Т-клеток человека (все клетки) с использованием аналогичного соотношения эффекторов NK-клеток и анти-CD48 антитела или диапазона титрования ADC, описанного выше. Однако для маркирования клеточной мембраны использовали набор с клеточным линкером и красителем PKH2 с зеленой флуоресценцией (Sigma) (не хром-51). Для измерения жизнеспособности Т-клеток методом проточной цитометрии использовали краситель 7-AAD, применяя проточный цитометр LSRII (Becton Dickinson).

[0161] Комплементзависимую цитотоксичность измеряли инкубированием нормальных Т-клеток человека или опухолевых клеток WIL2-S с серийно разведенным антителом (0,02-50 мкг/мл) в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки AB и 5 мкМ флуоресцентного красителя Sytox Green. Затем клетки инкубировали в течение 2 часов при 37 °C, 5% CO_2. Флуоресценцию от лизированных клеток измеряли на устройстве считывания планшетов Envision. Максимальный специфический лизис клеток-мишеней рассчитывали как процент относительно обработанных 1% раствором Triton X-100 контрольных клеток.

[0162] Антителозависимый клеточный фагоцитоз измеряли с использованием происходящих от макрофагов моноцитов как эффекторных клеток и красителя PKH26 с красной флуоресценцией, метившего нормальные человеческие Т-клетки (все клетки), WIL2-S или опухолевые клетки Raji. Клетки-мишени предварительно инкубировали с серийно разбавленным антителом (0,2 нг/мл - 2 мкг/мл) в течение 30 минут, а затем промывали два раза с фосфатно-солевым буферным раствором. К клеткам-мишеням добавляли макрофаги в соотношении 4:1 в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием

IgG и инкубировали в течение 2 часов при 37 °C, 5% CO_2. Затем макрофаги метили конъюгированным Alexa Fluor®-488 античеловеческим CD11b-антителом мыши. Были обнаружены положительные к опухолевым клеткам макрофаги в виде событий, показывающих зеленую и красную двойную флуоресценцию на проточном цитометре FACSCalibur. Максимальную специфическую фагоцитарную активность представляли как процент положительных к опухолям макрофагов после вычитания фоновой активности несвязывающего изотипного контроля.

[0163] Результаты. Активность АЗКЦ неконъюгированного антитела hMEM102 и ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) оценивали и сравнивали с активностью АЗКЦ CAMPATH® (алемтузумаб, анти-CD52 антитело) и ритуксимаба (анти-CD20 антитело). Как показано в табл. 3, гуманизированное антитело MEM102-HALA имеет умеренную активность АЗКЦ против нормальных покоящихся Т-клеток и линии опухолевых клеток WIL2-S. Активность АЗКЦ в значительной степени снижена при конъюгации 5088, приводя к 2,7-кратному уменьшению активности АЗКЦ в Т-клетках по сравнению с голым антителом.

Таблица 3. АЗКЦ

				Максимальный % специфического лизиса клеток			
Тип клеток	Кол-во CD48-рецепторов	Кол-во CD52-рецепторов	Кол-во CD20-рецепторов	hMEM102-HALA	hMEM102-HALA-5088	Кампат (CD52)	Ритуксимаб (CD20)
Нормальные Т-клетки человека (n=2)	38900	115200		65±3,1	24±4,4	60±3,5	
WIL2-5 (n=2)	359558	34200	502700	43±0,6	17±1,0		42±6,0

[0164] Результаты определения активности КЗЦ показаны в табл. 4. Ни неконъюгированное антитело hMEM102, ни ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) не проявили активность КЗЦ против нормальных покоящихся Т-клеток и опухолевых клеток WIL2-S. Как алемтузумаб, так и ритуксимаб проявили значительную активность

КЗЦ против клеток-мишеней.

Таблица 4. КЗЦ

				Максимальный % специфического лизиса клеток			
Тип клеток	Кол-во CD48-рецепторов	Кол-во CD52-рецепторов	Кол-во CD20-рецепторов	hMEM102-HALA	hMEM102-HALA-5088	Кампат (CD52)	Ритуксимаб (CD20)
Нормальные Т-клетки человека (n=2)	38900	115200		2,4±0,6	1,9±2,7	108±5,2	
WIL2-5 (n=2)	359558	34200	502700	0,9±0,2	1,4±0,9		66±1,4

[0165] Резельтаты определения АЗКФ показаны в табл. 5. Как неконъюгированное антитело hMEM102, так и ADC hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (5088) проявили умеренную активность АЗКФ против нормальных покоящихся Т-клеток или линий опухолевых клеток WIL2-S и Raji, согласующуюся с уровнями, которые наблюдали для кампата и ритуксимаба.

Таблица 5. АЗКФ

				Максимальный % специфического лизиса клеток			
Тип клеток	Кол-во CD48-рецепторов	Кол-во CD52-рецепторов	Кол-во CD20-рецепторов	hMEM102-HALA	hMEM102-HALA-5088	Кампат (CD52)	Ритуксимаб (CD20)
Нормальные Т-клетки человека (n=2)	38900	115200		56	54	57	
WIL2-5 (n=2)	359558	34200	502700	62	60		56

Raji	249023 (24%)	29200	394100	37	34		57

Понятно, что примеры и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и специалистами в данной области могут быть предложены их различные модификации или изменения, которые должны быть включены в сущность и сферу действия данной заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, тем самым включены в полном объеме путем ссылки во всех смыслах.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БЕЗ СОБЛЮДЕНИЯ ФОРМАЛЬНЫХ ТРЕБОВАНИЙ

SEQ ID NO:1, hMEM102 HA - Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTFTGEPS YGNVFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:2, hMEM102 LA - Вариабельный участок легкой цепи

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNIHWYQQKPDQSPKLLIKYTSESISGVP SRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPLTFGGGTKVEIKR

SEQ ID NO:3, CDR1 тяжелой цепи

DFGMN

SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи

WINTFTGEPSYGNVFKG

SEQ ID NO:5, CDR3 тяжелой цепи

RHGNGNVFDS

SEQ ID NO:6, CDR1 легкой цепи

RASQSIGSNIH

SEQ ID NO:7, CDR2 легкой цепи

YTSESIS

SEQ ID NO:8, CDR3 легкой цепи

QQSNSWPLT

SEQ ID NO:9, hMEM102 HA H-цепь G1

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTFTGEPS YGNVFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO:10, hMEM102 LA L-цепь

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNIHWYQQKPDQSPKLLIKYTSESISGVP SRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:11, Константный участок тяжелой цепи природного происхождения

astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqs
sglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpSv
flfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvs
vltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltcl
vkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal
hnhytqkslslspg

SEQ ID NO:12, Константный участок легкой цепи

tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqd
skdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SEATTLE GENETICS, INC.

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD48 И ИХ КОНЪЮГАТЫ

<130> 4000-00111PC

<150> US 62/134981
<151> 2015-03-18

<160> 12

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1
<211> 119
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> hMEM102 HA - Вариабельный участок тяжелой цепи

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 108
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> hMEM102 LA - Вариабельный участок легкой цепи

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 3
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 тяжелой цепи

<400> 3

Asp Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 тяжелой цепи

<400> 4

Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи

<400> 5

Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 легкой цепи

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Ile His
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 легкой цепи

<400> 7

Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 легкой цепи

<400> 8

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 9
<211> 449
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> hMEM102 HA H-цепь G1

<400> 9

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
            20                  25                  30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Gly Asn Val Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg His Gly Asn Gly Asn Val Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
```

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 10
<211> 214
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> hMEM102 LA L-цепь

<400> 10

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
```

```
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 11
<211> 329
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> Константный участок тяжелой цепи природного происхождения

<400> 11

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
```

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 12
<211> 106
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> Константный участок легкой цепи

<400> 12

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерное или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком CD48 человека, причем данное антитело содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:6-8, и при этом данное антитело проявляет более высокую аффинность связывания с белком CD48 человека по сравнению с мышиным антителом, которое специфически связывается с белком CD48 человека и содержит последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:3-5 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:6-8.

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что химерное или гуманизированное антитело проявляет по меньшей мере в 2 раза более высокую аффинность связывания с белком CD48 человека по сравнению с мышиным антителом.

3. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что данное антитело является гуманизированным антителом.

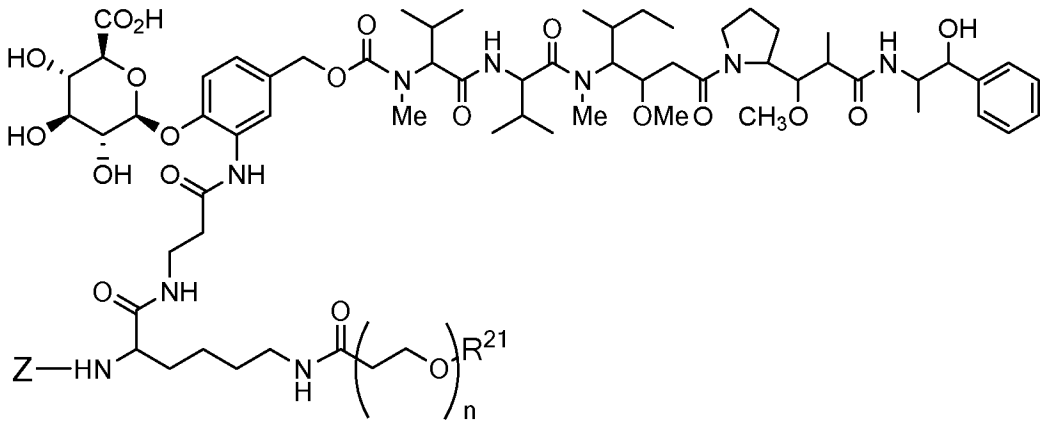
4. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что данное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1.

5. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что данное антитело содержит вариабельный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2.

6. Антитело по п. 4, отличающееся тем, что данное антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1.

7. Антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что данное антитело конъюгировано с цитотоксическим лекарственным средством, присоединенным к линкеру.

8. Антитело по п. 7, отличающееся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:

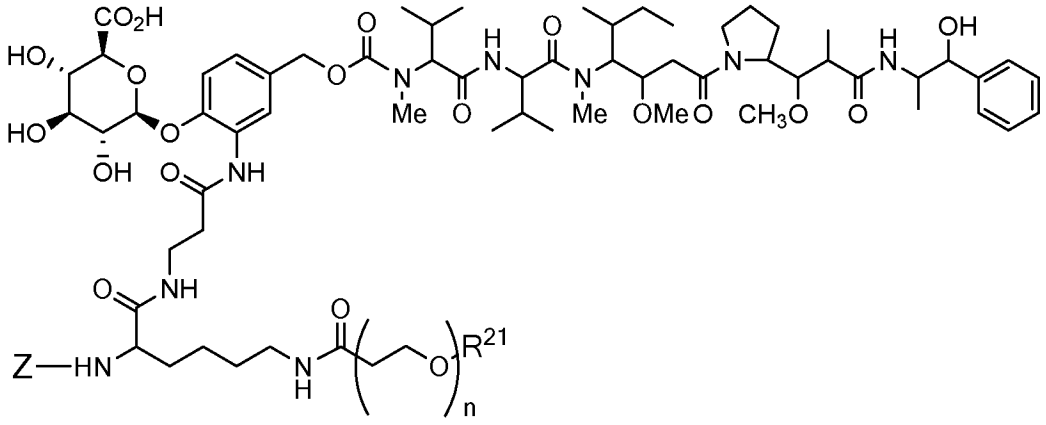


или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, образуя с ней ковалентное соединение, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

9. Гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком CD48 человека, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и вариабельный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2.

10. Антитело по любому из п. 9, отличающееся тем, что данное антитело конъюгировано с цитотоксическим лекарственным средством, присоединенным к линкеру.

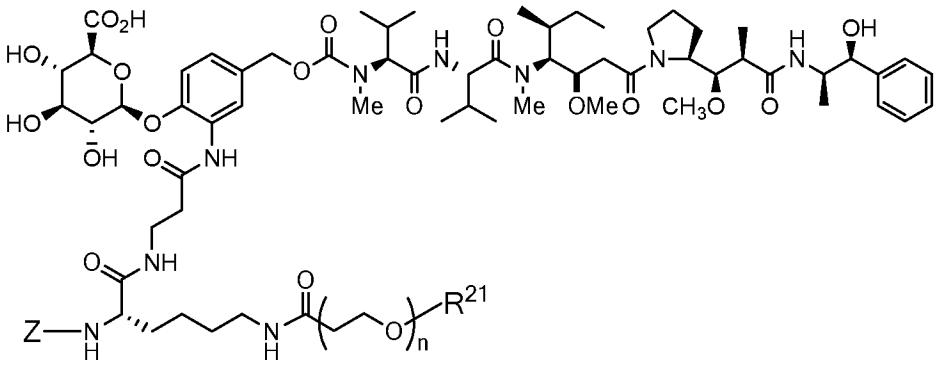
11. Антитело по п. 10, отличающееся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий

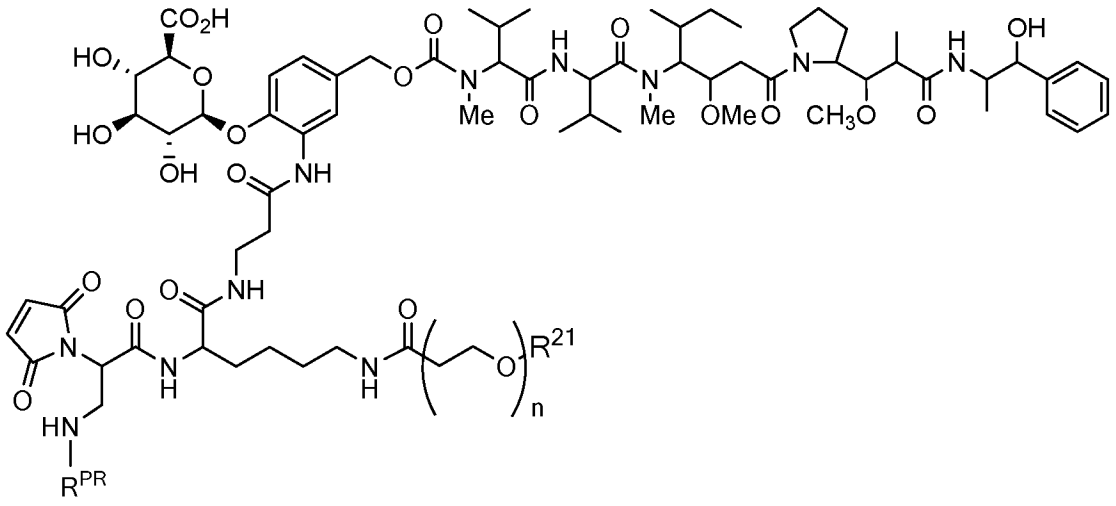
реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, образуя с ней ковалентное соединение, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

12. Антитело по п. 10, отличающееся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, образуя с ней ковалентное соединение, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

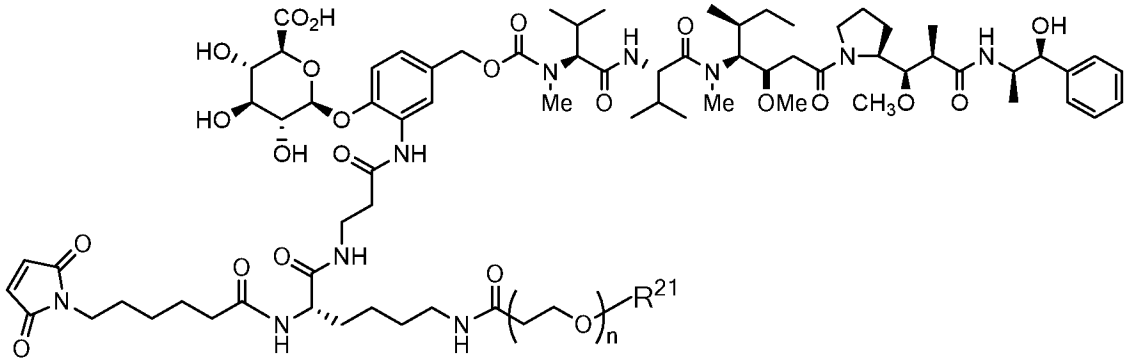
13. Антитело по п. 10, отличающееся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую

единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

14. Антитело по п. 10, отличающееся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

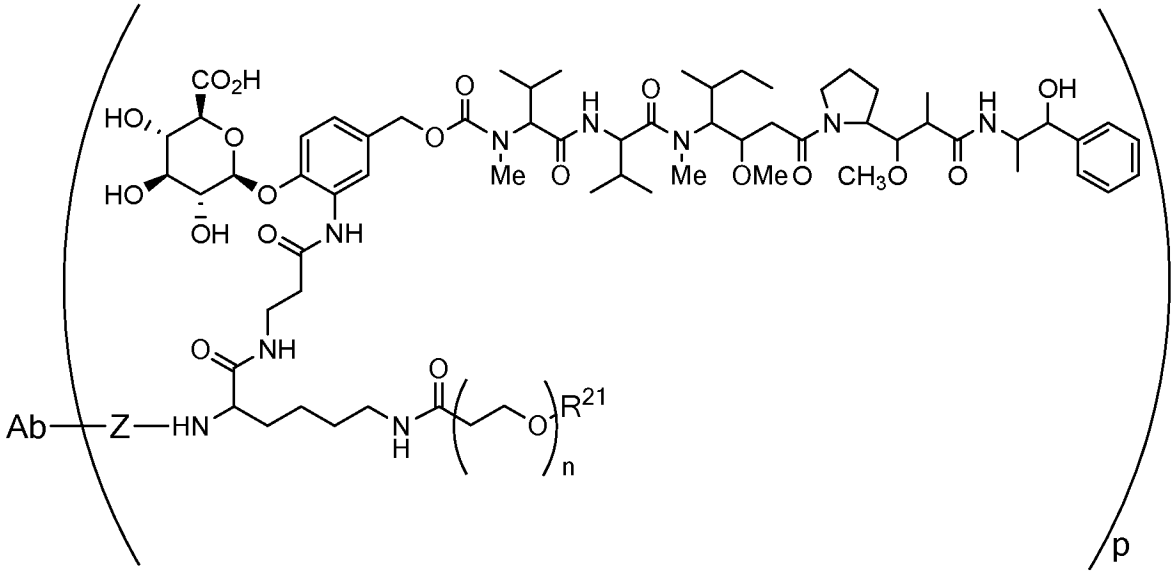
15. Антитело по п. 1 или 9, отличающееся тем, что n находится в диапазоне от 8 до 14.

16. Антитело по п. 1 или 9, отличающееся тем, что n находится в диапазоне от 10 до 12.

17. Антитело по п. 1 или 9, отличающееся тем, что n равно 12.

18. Антитело по любому из пп. 15-17, отличающееся тем, что R^{21} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_2CO_2H$.

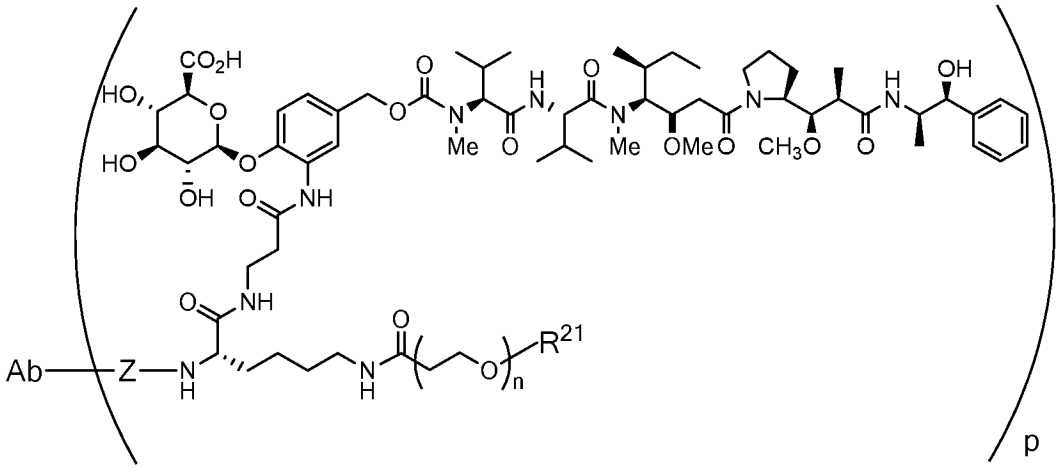
19. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства, имеющее формулу



или ее фармацевтически приемлемую соль, где Ab представляет

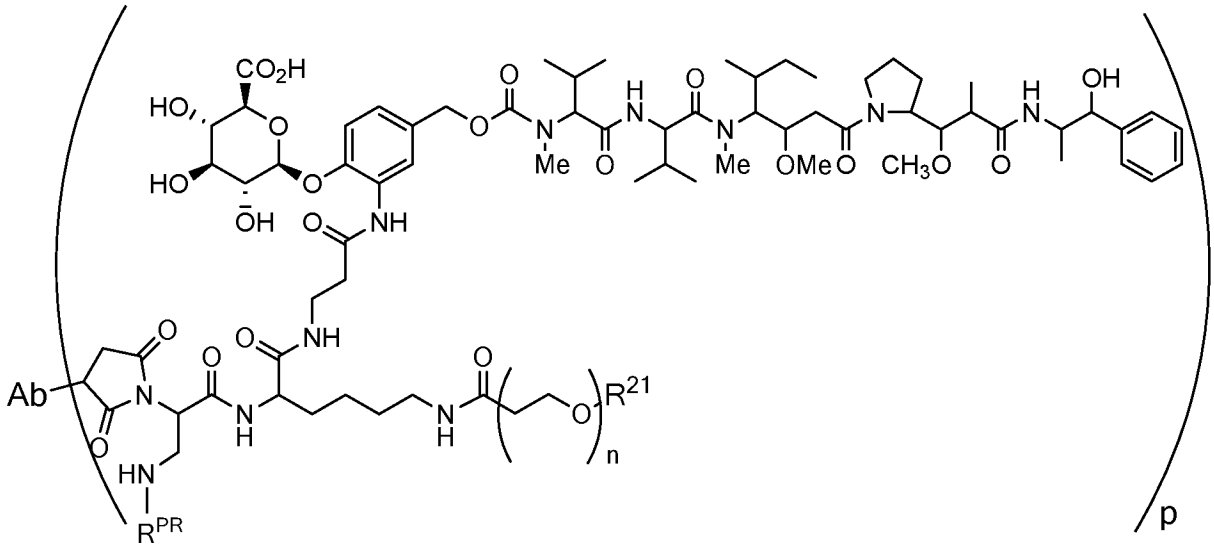
собой анти-CD48 антитело по п. 1 или 9, где Z представляет собой органический фрагмент, связывающий антитело и остаток лекарственного средства-линкера посредством ковалентных связей, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля, а p составляет от 1 до 16.

20. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. 19, отличающееся тем, что данное соединение имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью.

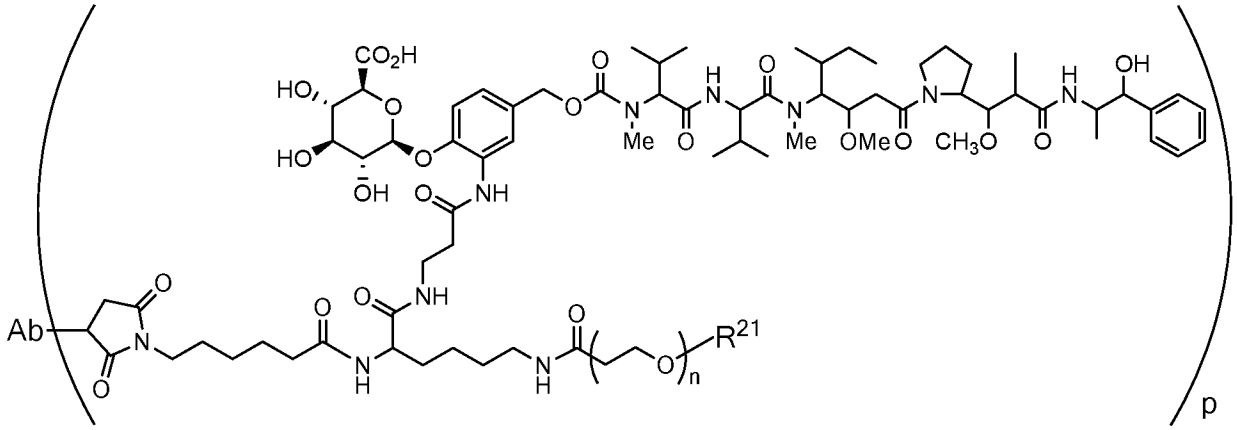
21. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. 19, отличающееся тем, что данное соединение имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу.

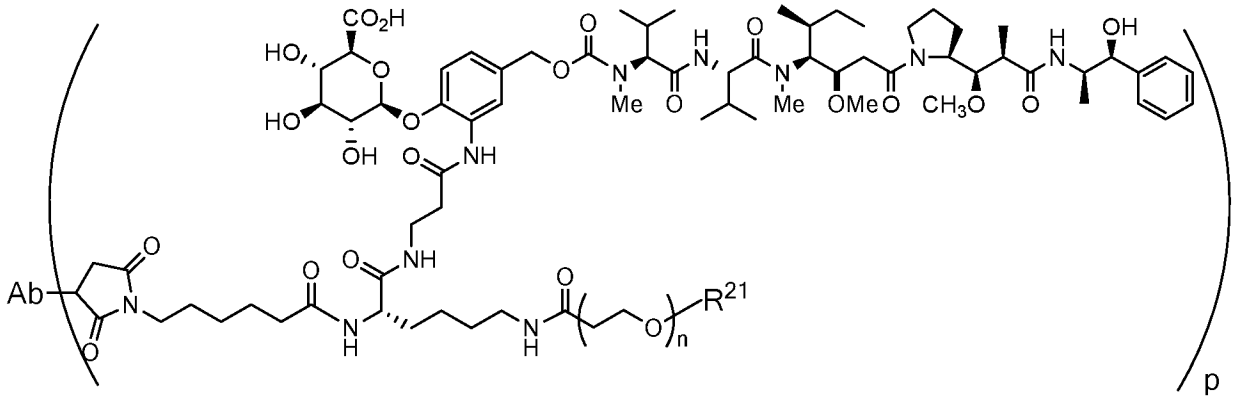
22. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного

средства по п. 19, отличающееся тем, что данное соединение имеет формулу



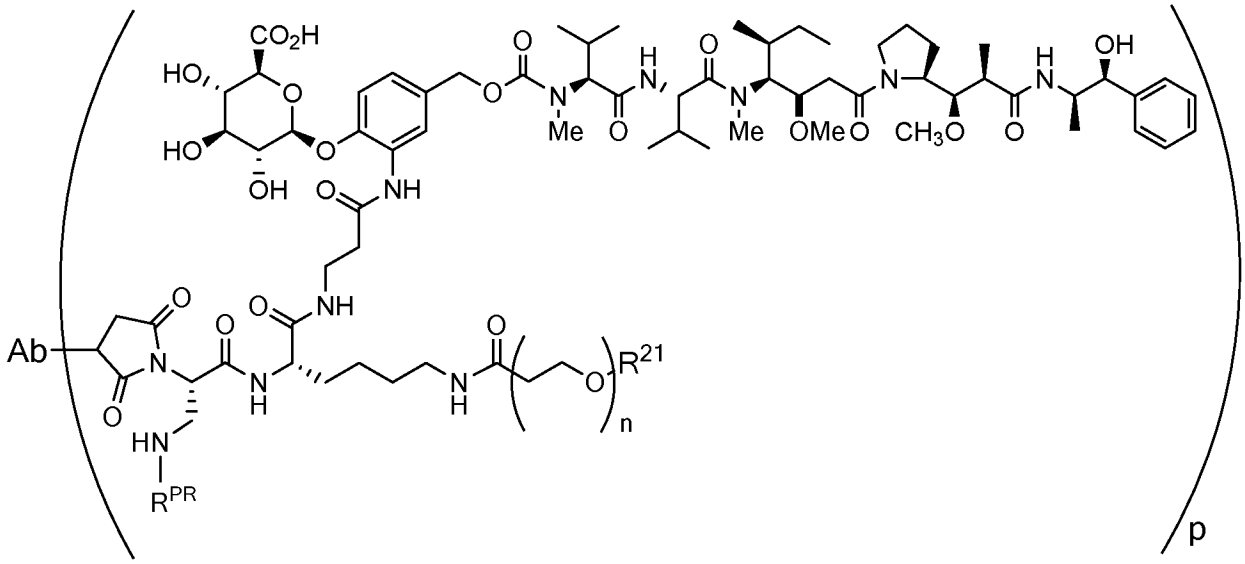
или является ее фармацевтически приемлемой солью.

23. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. 19, отличающееся тем, что данное соединение имеет формулу



или является ее фармацевтически приемлемой солью.

24. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. 19, отличающееся тем, что данное соединение имеет формулу



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу.

25. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. любому из пп. 19-24, отличающееся тем, что n находится в диапазоне от 8 до 14.

26. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. любому из пп. 19-24, отличающееся тем, что n находится в диапазоне от 10 до 12.

27. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. любому из пп. 19-24, отличающееся тем, что n равно 12.

28. Соединение конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по п. любому из пп. 19-27, отличающееся тем, что R21 представляет собой -CH3 или -CH2CH2CO2H.

29. Соединение конъюгата антитела-лекарственного средства по п. любому из пп. 19-28, отличающееся тем, что p равно 8.

30. Соединение конъюгата антитела-лекарственного средства по п. любому из пп. 19-29, отличающееся тем, что присоединение Ab происходит посредством цистеиновых остатков из дисульфидных связей между цепями антитела.

31. Композиция конъюгата антитела-лекарственного средства, содержащая популяцию молекул конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства по любому из пп. 19-30, отличающаяся тем, что среднее значение нагрузки лекарственным средством композиции равно 8 и преобладающее значение нагрузки

лекарственным средством равно 8.

32. Композиция по п. 31, отличающаяся тем, что данная композици представляет собой фармацевтическую композицию.

33. Способ лечения пациента с экспрессирующим CD48 раковым заболеванием, включающий этап введения данному пациенту композиции по п. 31.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что экспрессирующее CD48 раковое заболевание представляет собой множественную миелому.

35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что экспрессирующее CD48 раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из B-клеточных неоплазий и острой миелоидной лейкемии.

36. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6-8, антитела, которое специфически связывается с белком CD48 человека.

37. Выделенный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 36.

38. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 37.

39. Клетка-хозяин по п. 38, отличающаяся тем, что данная клетка является клеткой-хозяином от млекопитающего.

40. Клетка-хозяин по п. 39, отличающаяся тем, что данная клетка выбрана из группы, состоящей из CHO, COS, HeLA, HEK293, L, Sp2/0 и NS0.

41. Способ получения анти-CD48 антитела, включающий:

культивирование клетки-хозяина по п. 38 в условиях, подходящих для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело; и

выделение антитела.

42. Способ получения конъюгата анти-CD48 антитела-лекарственного средства, включающий:

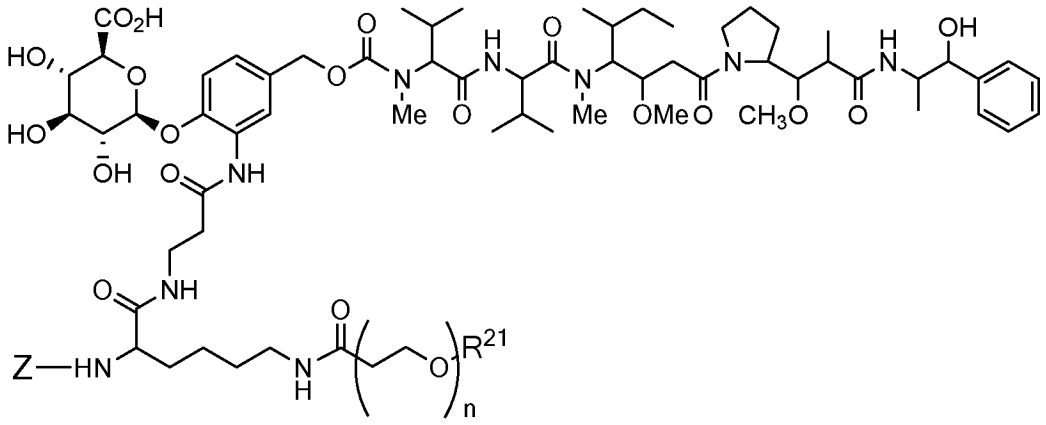
культивирование клетки-хозяина по п. 38 в условиях, подходящих для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей

антитело;

выделение антитела и

конъюгирование цитотоксического лекарственного средства, присоединенного к линкеру, с данным антителом.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, образуя с ней ковалентное соединение, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

44. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

45. Выделенный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 44.

46. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 45.

47. Клетка-хозяин по п. 46, отличающаяся тем, что данная клетка-хозяин является клеткой-хозяином от млекопитающего.

48. Клетка-хозяин по п. 47, отличающаяся тем, что данная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CHO, COS, HeLA, HEK293, L, Sp2/0 и NS0.

49. Способ получения анти-CD48 антитела, включающий:

культивирование клетки-хозяина по п. 46 в условиях, подходящих для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело; и

выделение антитела.

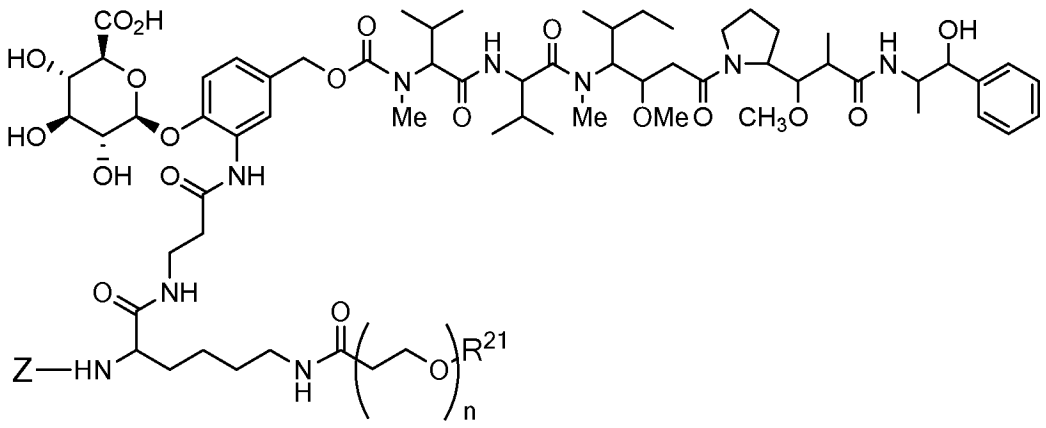
50. Способ получения конъюгата лекарственного средства-анти-CD48 антитела, включающий:

культивирование клетки-хозяина по п. 46 в условиях, подходящих для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело;

выделение антитела и

конъюгирование цитотоксического лекарственного средства, присоединенного к линкеру, с данным антителом.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что лекарственное средство-линкер имеет формулу:



или является ее фармацевтически приемлемой солью, где Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный сайт, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе, образуя с ней ковалентное соединение, n находится в диапазоне от 8 до 36, R^{PR} представляет собой атом водорода или защитную группу, R^{21} представляет собой кэппирующую единицу фрагмента полиэтиленгликоля.

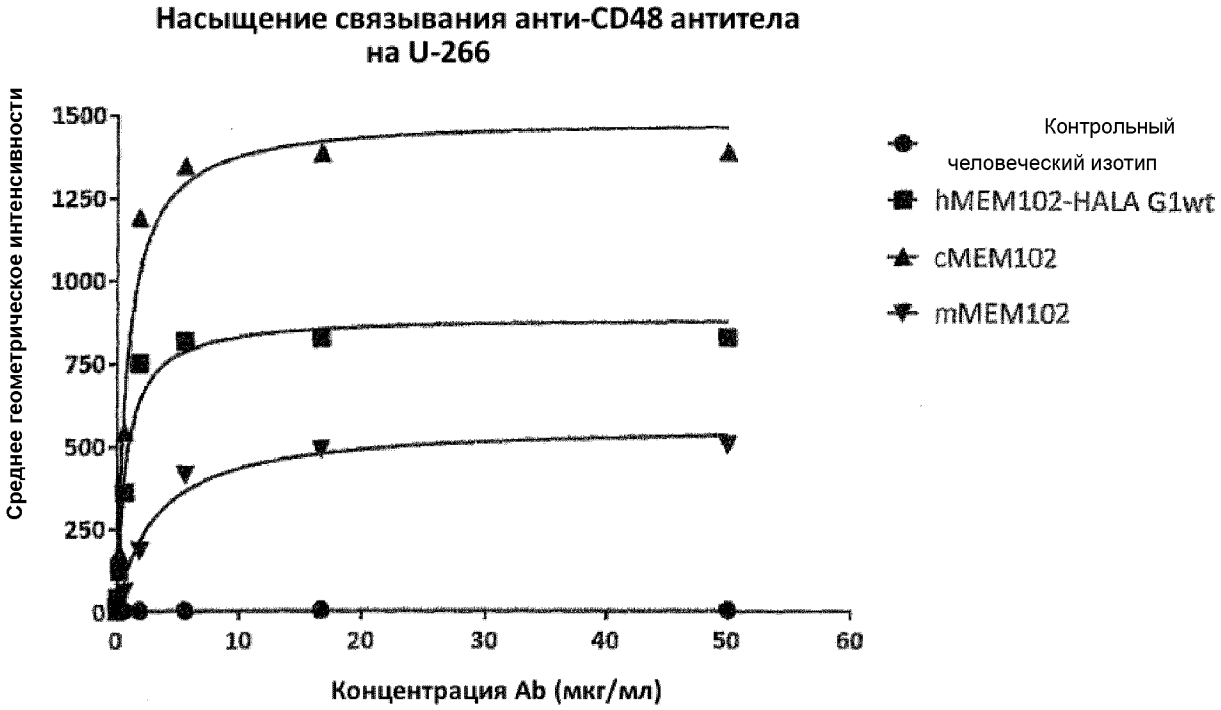
По доверенности

```
                        10        20        30        40        50        60
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
mMEM102 vH      .I......P......ET..I..........DFG.........K..........F..E.S.GNV.K...AL
hIGVH7-4-1/JH5  QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVF
hMEM102 vHA     ............................DFG.....................F..E.S.GNV.K.....
hMEM102 vHB     .I..........................DFG.....................F..E.S.GNV.K....L
hMEM102 vHC     .I..........................DFG.....................F..E.S.GNV.K....L

                70        80            90        100         110
                |....|....|.......|....|....|....|......|....|...
mMEM102 vH      ..E..AT......NN..S....T.F...RHGNG.V........TL....
hIGVH7-4-1/JH5  SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR-----NWFDSWGQGTLVTVSS
hMEM102 vHA     ............................RHGNG.V..............
hMEM102 vHB     ............................RHGNG.V..............
hMEM102 vHC     ......T..................F...RHGNG.V..............
```

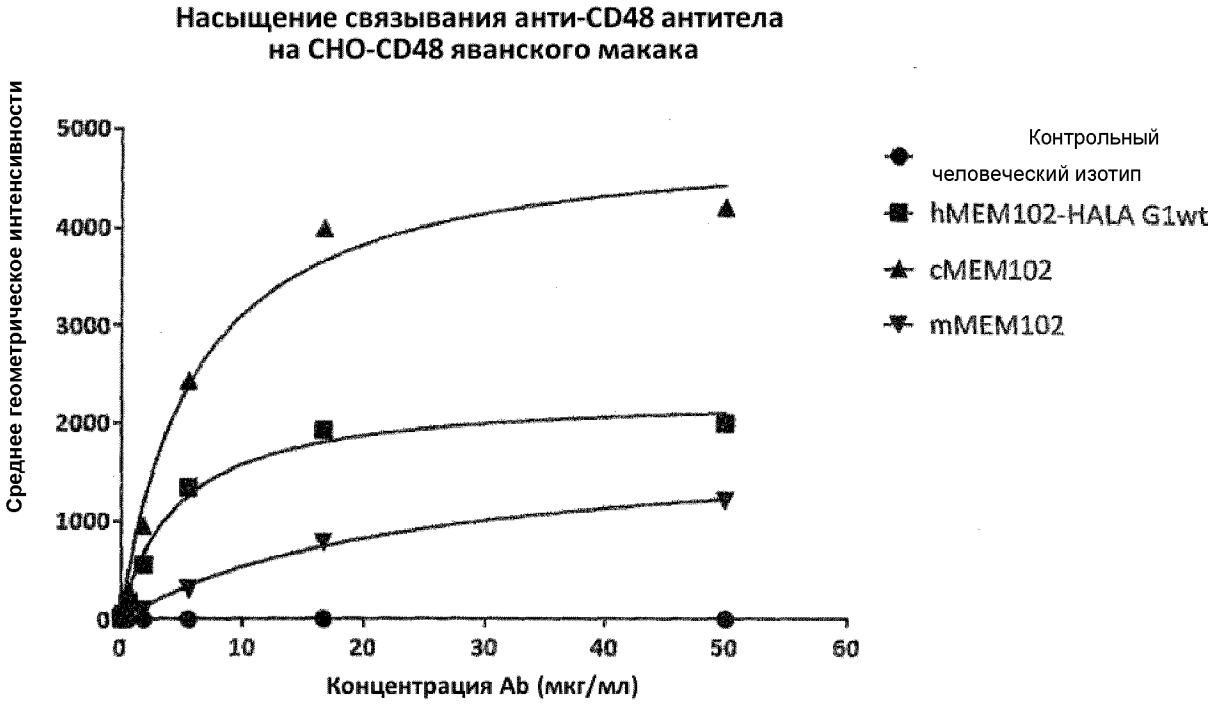
ФИГ. 1

```
                    10        20        30        40        50        60        70
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
mMEM102 vL      D.LL....AIL..S.G.G.SFS.....S.GSNI.....RTNG..R....YT.E....I......N.G...
hIGVK6-21/JK4   EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSISGVPSRFSGSGSGTD
hMEM102 vLA     ...L.................I......S.GSNI................YT.E.................
hMEM102 vLB     ...L.................I......S.GSNI............R....YT.E....I............
hMEM102 vLC     D.LL.................F......S.GSNI............R....YT.E....I............

                    80        90       100
                ....|....|....|....|....|....|....|...
mMEM102 vL      ...S.S.V.S..I.E...QQSNSWP........L.L..
hIGVK6-21/JK4   FTLTINSLEAEDAATYYC-------LTFGGGTKVEIKR
hMEM102 vLA     ..................QQSNSWP.............
hMEM102 vLB     ..................QQSNSWP.............
hMEM102 vLC     ..................QQSNSWP.............
```

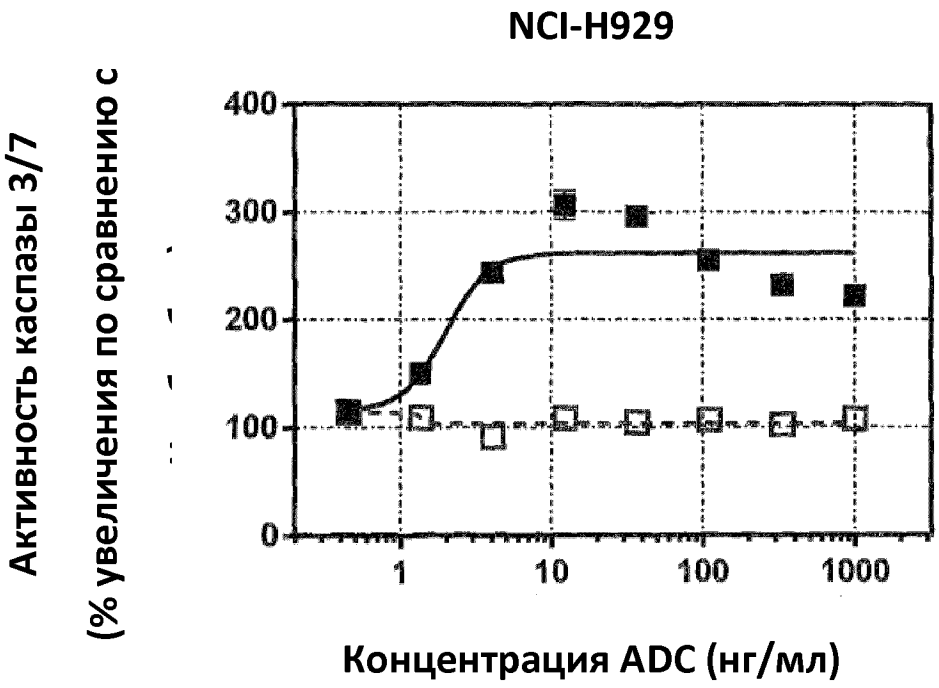
ФИГ. 2


Насыщение связывания анти-CD48 антитела на U-266
Среднее геометрическое интенсивности
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
60
Концентрация Ab (мкг/мл)
Контрольный человеческий изотип
hMEM102-HALA G1wt
cMEM102
mMEM102

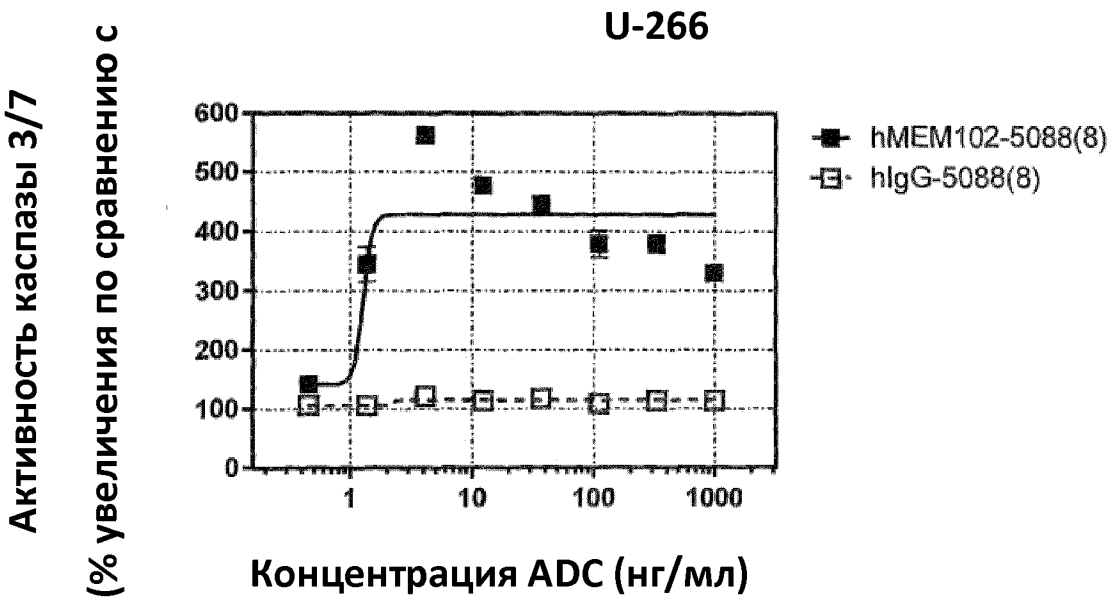
ФИГ. 3


Насыщение связывания анти-CD48 антитела
на CHO-CD48 яванского макака
Среднее геометрическое интенсивности
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
60
Концентрация Ab (мкг/мл)
Контрольный
человеческий изотип
hMEM102-HALA G1wt
cMEM102
mMEM102

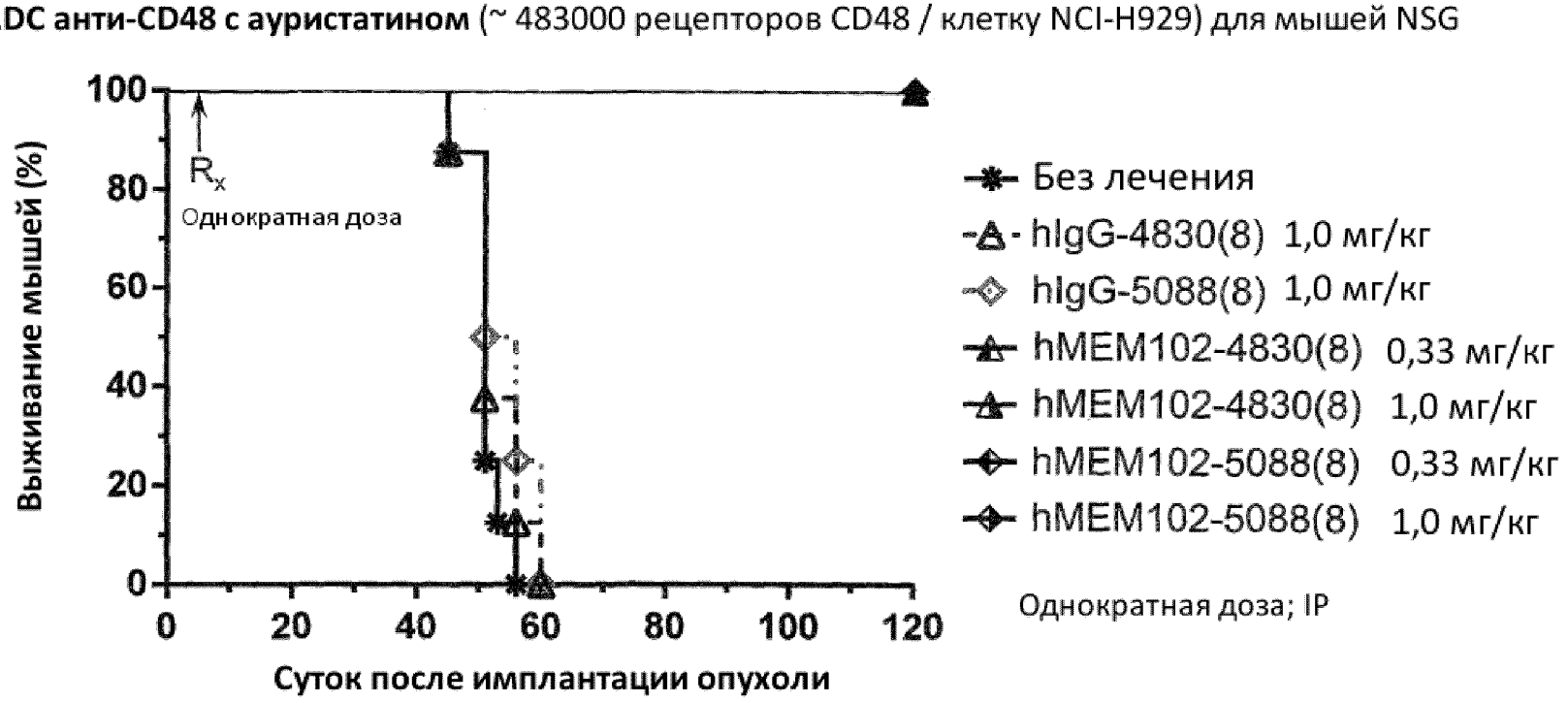
ФИГ. 4


NCI-H929
Активность каспазы 3/7
(% увеличения по сравнению с
400
300
200
100
0
1
10
100
1000
Концентрация ADC (нг/мл)

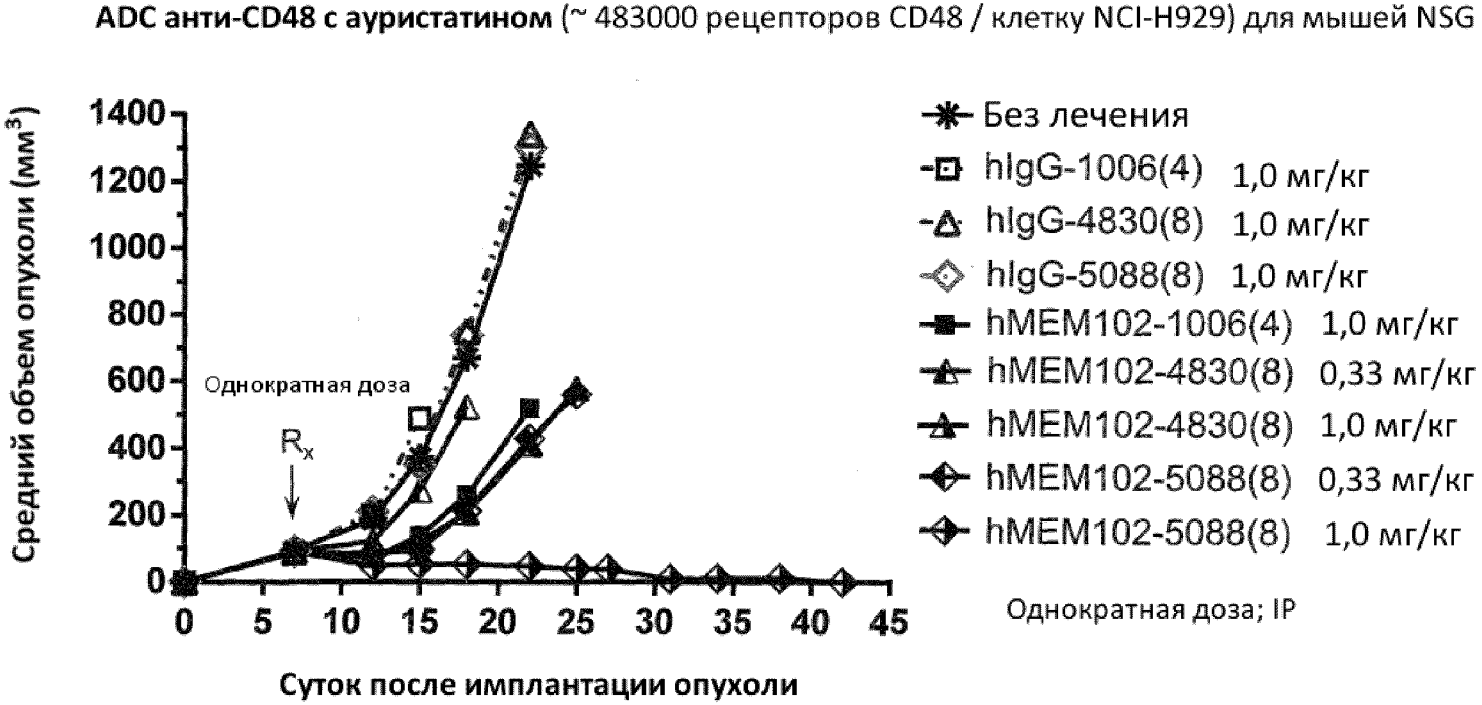
ФИГ. 5


U-266
Активность каспазы 3/7
(% увеличения по сравнению с
600
500
400
300
200
100
0
1
10
100
1000
Концентрация ADC (нг/мл)
hMEM102-5088(8)
hIgG-5088(8)

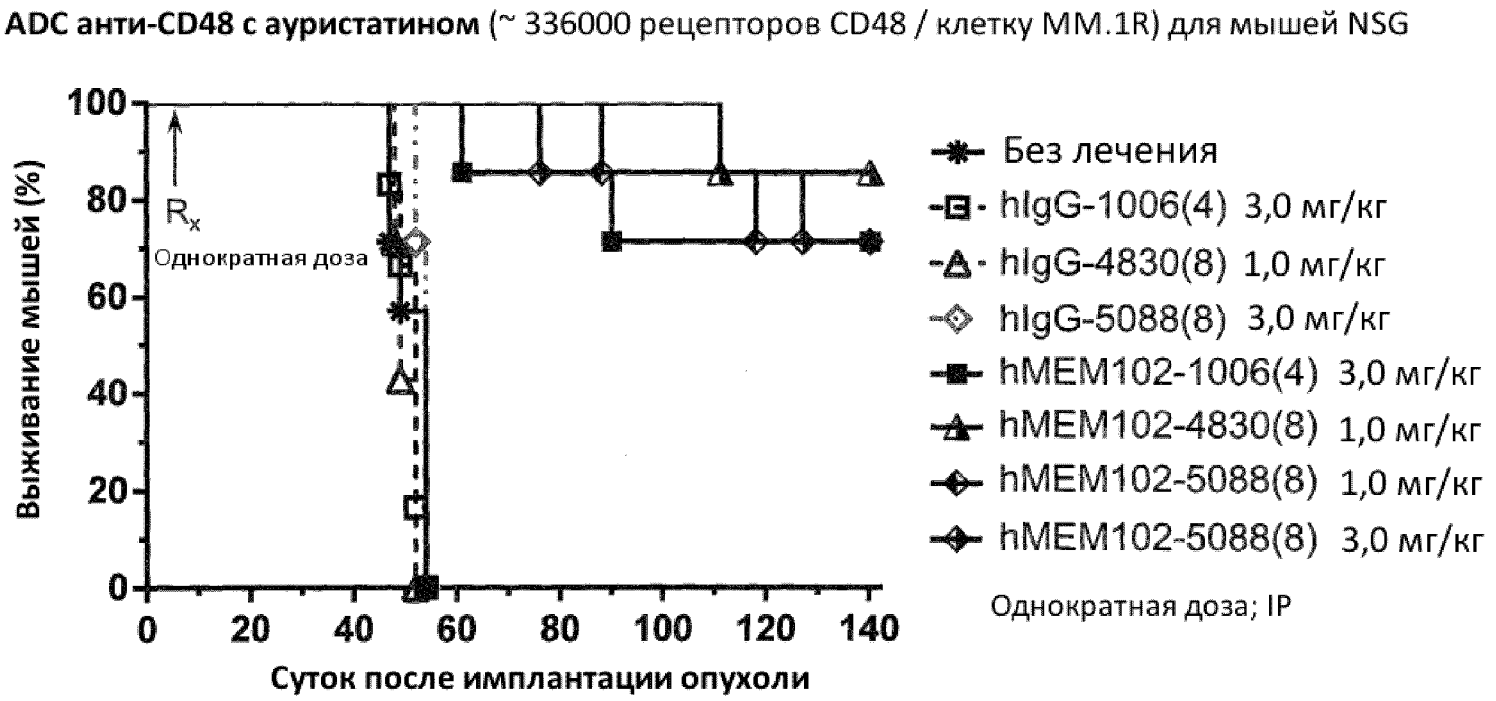
ФИГ. 6


ADC анти-CD48 с ауристатином (~ 483000 рецепторов CD48 / клетку NCI-H929) для мышей NSG
Выживание мышей (%)
100
80
60
40
20
0
Rx
Однократная доза
0
20
40
60
80
100
120
Суток после имплантации опухоли
Без лечения
hIgG-4830(8) 1,0 мг/кг
hIgG-5088(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-4830(8) 0,33 мг/кг
hMEM102-4830(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-5088(8) 0,33 мг/кг
hMEM102-5088(8) 1,0 мг/кг
Однократная доза; IP

ФИГ. 7


ADC анти-CD48 с ауристатином (~ 483000 рецепторов CD48 / клетку NCI-H929) для мышей NSG
Средний объем опухоли (мм3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Однократная доза
Rx
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Суток после имплантации опухоли
Без лечения
hIgG-1006(4) 1,0 мг/кг
hIgG-4830(8) 1,0 мг/кг
hIgG-5088(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-1006(4) 1,0 мг/кг
hMEM102-4830(8) 0,33 мг/кг
hMEM102-4830(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-5088(8) 0,33 мг/кг
hMEM102-5088(8) 1,0 мг/кг
Однократная доза; IP

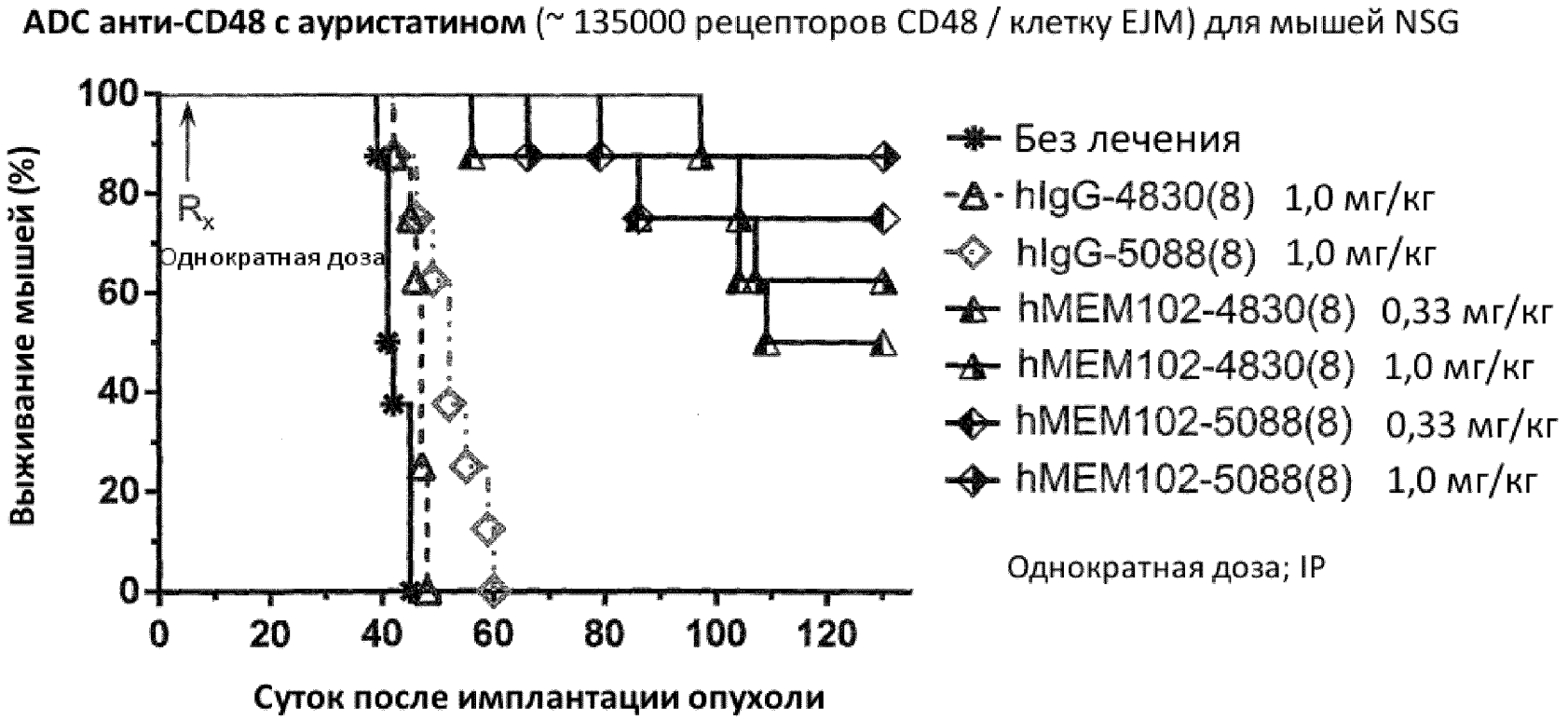
ФИГ. 8


ADC анти-CD48 с ауристатином (~ 336000 рецепторов CD48 / клетку MM.1R) для мышей NSG
Выживание мышей (%)
100
80
60
40
20
0
Rx
Однократная доза
0
20
40
60
80
100
120
140
Суток после имплантации опухоли
Без лечения
hIgG-1006(4) 3,0 мг/кг
hIgG-4830(8) 1,0 мг/кг
hIgG-5088(8) 3,0 мг/кг
hMEM102-1006(4) 3,0 мг/кг
hMEM102-4830(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-5088(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-5088(8) 3,0 мг/кг
Однократная доза; IP

ФИГ. 9

ADC анти-CD48 с ауристатином (~ 336000 рецепторов CD48 / клетку MM.1R) для мышей NSG

ФИГ. 10


ADC анти-CD48 с ауристатином (~ 135000 рецепторов CD48 / клетку EJM) для мышей NSG
Выживание мышей (%)
100
80
60
40
20
0
Rx
Однократная доза
0
20
40
60
80
100
120
Суток после имплантации опухоли
Без лечения
hIgG-4830(8) 1,0 мг/кг
hIgG-5088(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-4830(8) 0,33 мг/кг
hMEM102-4830(8) 1,0 мг/кг
hMEM102-5088(8) 0,33 мг/кг
hMEM102-5088(8) 1,0 мг/кг
Однократная доза; IP

ФИГ. 11