

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040277**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.17</p> <p>(21) Номер заявки
201790850</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2011.09.29</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>A61K 39/44</i> (2006.01)
<i>A61K 31/16</i> (2006.01)
<i>A61K 31/165</i> (2006.01)
<i>A61K 31/195</i> (2006.01)
<i>A61K 47/64</i> (2017.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (ADC), СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С БЕЛКАМИ 191P4D12

- | | |
|---|--|
| <p>(31) 61/387,933</p> <p>(32) 2010.09.29</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2017.11.30</p> <p>(62) 201300411; 2011.09.29</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭДЖЕНСИС, ИНК.; СИДЖЕН ИНК.
(US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Сагпаев Даулет, Моррисон Роберт
Кендол, Моррисон Карен Джейн</p> | <p>Мейрик, Гудас Жан, Джейкобовиц
Ая, Торгов Майкл, Эн Зили (US)</p> <p>(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)</p> <p>(56) WO-A2-2004010957
US-A1-20040083497
DORONINA Svetlana O. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjugate Chem. 2006, 17, cc. 114-124
US-A-5122368</p> |
|---|--|

- (57) Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC's), связывающимся с белком 191P4D12 и его вариантами. Данное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 45 до 52 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 70 до 77 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 116 до 125 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 49 до 54 остатка в SEQ ID NO: 8, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 72 до 74 остатка в SEQ ID NO: 8, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 111 до 119 остатка в SEQ ID NO: 8. В другом варианте воплощения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, входящие в состав конъюгата, содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую гипервариабельные участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельной области тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером PTA-11267, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельной области легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в ATCC под номером PTA-11267, где CDR определяют согласно схеме нумерации IMGT. В нормальной ткани взрослого человека наблюдается тканеспецифическая экспрессия 191P4D12, а в злокачественных опухолях, таких как рак поджелудочной железы, яичника, молочной железы, легкого и мочевого пузыря, наблюдается аберрантная экспрессия 191P4D12. Соответственно ADC изобретения обеспечивают фармацевтическую композицию для лечения рака. Также в изобретении предлагается способ лечения рака, где применяется ADC согласно изобретению.

040277
B1

040277
B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка является предварительной патентной заявкой, которая испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/387933, поданной 29 сентября 2010. Содержание каждой из заявок, перечисленных в этом параграфе, полностью включается в описание путем отсылки.

Ссылка на список последовательностей, перечисленных посредством EFS-WEB

Полное содержание следующего электронного представления списка последовательности через сервер USPTO EFS-WEB, как официально разрешено и установлено в МРЕР §1730 П.В.2(a)(C), включается в описание путем отсылки полностью и во всех отношениях. Список последовательности устанавливается по зарегистрированному в электронном виде текстовому файлу, как указано ниже

Название файла	Дата создания	размер (байт)
511582008250Seqlist.txt	27 сентября 2011	41,949 байт

Утверждение прав на изобретения, сделанные при финансировании исследований из федерального бюджета, не применимо к данному случаю.

Область техники, к которой относится изобретение

Описанное здесь изобретение относится к антителам, связывающим фрагментам и конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADCs), которые связываются с белками, названными 191P4D12. Изобретение также относится к прогностическим, профилактическим и терапевтическим способам и композициям, пригодным для лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих 191P4D12.

Известный уровень техники

Рак является второй после ишемической болезни сердца лидирующей причиной смерти человека. Миллионы людей по всему миру умирают от рака каждый год. Ежегодно только в Соединенных Штатах, по данным Американского Онкологического Общества, рак является причиной смерти более полумиллиона человек, причем в год диагностируется более 1,2 млн новых случаев. В то время как смертность от заболеваний сердца значительно снижается, смертность от рака в целом возрастает. По прогнозам, в начале следующего столетия рак станет ведущей причиной смерти.

Некоторые формы рака выделяются как "главные убийцы" во всем мире. В частности, карциномы легких, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, яичника и мочевого пузыря являются основными причинами смерти от рака. Эти и практически все прочие карциномы обладают общим свойством - летальностью. За очень редким исключением метастазирование карциномы приводит к смертельному исходу. Кроме того, общий опыт показывает, что жизнь, даже для тех больных раком, которые остались живы после первичного рака, кардинально изменяется. Множество больных раком испытывают сильную тревогу, обусловленную сознанием возможности рецидива или неэффективности лечения. Множество больных раком испытывают физическое истощение после лечения. Кроме того, многие больные раком подвержены рецидивам.

По всему миру рак предстательной железы является четвертым среди наиболее распространенных видов рака у мужчин. В Северной Америке и Северной Европе он, безусловно, является самым распространенным видом рака у мужчин и второй лидирующей причиной смерти от рака у мужчин. Только в Соединенных Штатах более 30000 мужчин ежегодно умирают от этого заболевания, уступающего только раку легких. Несмотря на масштабы этих показателей, эффективного лечения метастатического рака предстательной железы все еще не существует. Хирургическое удаление предстательной железы, лучевая терапия, гормон-подавляющая терапия, хирургическая кастрация и химиотерапия по-прежнему являются основными методами лечения. К сожалению, эти методы лечения для многих не являются эффективными и часто связаны с нежелательными последствиями.

К вопросу о диагностировании, существенным ограничением в постановке диагноза и тактике ведения заболевания остается недостаток маркеров опухолей предстательной железы, которые могли бы достоверно выявлять локализованные опухоли на ранних стадиях. Несмотря на то, что количественный анализ сывороточного простат-специфического антигена (PSA) был очень полезным инструментом, его специфичность и универсальность по праву считаются недостаточными в некоторых важных аспектах.

Прогресс в идентификации дополнительных специфических маркеров рака предстательной железы был достигнут путем создания ксенотрансплантатов рака предстательной железы, способных повторять разные стадии заболевания у мышей. Ксенотрансплантаты LAPC (рак предстательной железы Лос-Анджелес) представляют собой ксенотрансплантаты рака предстательной железы, пассаж которого выжил у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) и обнаружил способность имитировать переход от андрогено-зависимости к андрогено-независимости (Klein et al., 1997, Nat. Med. 3:402). Идентифицированные совсем недавно маркеры рака предстательной железы включают PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), простат-специфический мембранный антиген (PSMA) (Pinto et al., Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8) и антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA) (Reiter et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

Несмотря на то, что обнаруженные ранее маркеры, такие как PSA, способствуют действиям, направленным на диагностирование и лечение рака предстательной железы, существует необходимость в

выявлении дополнительных маркеров и терапевтических мишеней для рака предстательной железы и родственных видов рака для дальнейшего совершенствования диагностики и терапии. По оценкам, в 2000 году в Соединенных Штатах наблюдалось 130200 случаев колоректального рака, включая 93800 случаев рака толстой кишки и 36400 случаев рака прямой кишки.

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака у мужчин и женщин. Заболеваемость значительно снизилась в период 1992-1996 (-2.1% в год). Исследования указывают на то, что это снижение было обусловлено увеличением массового обследования и удалением полипов, предотвращающим развитие полипов в инвазивные виды рака. В 2000 году насчитывалось 56300 смертей (47700 от рака толстой кишки, 8600 от рака прямой кишки), что составляет приблизительно 11% всех смертей от рака в США.

В настоящее время, хирургическая операция является наиболее распространенной формой лечения колоректального рака, а для неметастазирующих видов рака она зачастую является излечивающей операцией. Химиотерапия или химиотерапия плюс облучение назначается до или после хирургической операции для большинства пациентов, у которых рак привел к глубокому прободению стенки кишечника или метастазировал в лимфатические узлы. Иногда при раке толстой кишки необходима постоянная колостомия (создание брюшного отверстия для удаления экскрементов), а в некоторых случаях она требуется при раке прямой кишки. Потребность в эффективных методах диагностики и лечения колоректального рака по-прежнему сохраняется.

Рак мочевого пузыря составляет приблизительно 5% у мужчин из всех новых случаев рака в Соединенных Штатах (пятое наиболее распространенное новообразование) и 3 процента у женщин (восьмое наиболее распространенное новообразование). Заболеваемость медленно увеличивается одновременно с увеличением популяции пожилых людей. В 1998 насчитывалось 54500 случаев, включая 39500 у мужчин и 15000 у женщин. Стандартизированная по возрасту заболеваемость в Соединенных Штатах составляет 32 на 100000 для мужчин и восемь на 100000 у женщин. Исторически сложившееся соотношение заболеваемости среди мужчин и женщин (мужчины/женщины), равное 3:1, может быть снижено в связи с тенденциями табакокурения у женщин. В 1998 насчитывалось 11000 смертей от рака мочевого пузыря (7800 у мужчин и 3900 у женщин). Заболеваемость и смертность от рака мочевого пузыря резко увеличивается с возрастом и является растущей проблемой в связи со старением популяции.

Большинство видов рака мочевого пузыря снова возникает (рецидивирует) в мочевом пузыре. С раком мочевого пузыря справляются комбинацией трансуретральной резекции мочевого пузыря (TUR) и внутрипузырной химиотерапии или иммунотерапии. Множественная и рецидивирующая природа рака мочевого пузыря акцентирует внимание на недостатках TUR. Большинство видов рака, прорастающих в мышечный слой, не излечиваются только с помощью TUR. Радикальная цистэктомия и отведение мочи являются наиболее эффективными способами устранения рака, но оказывают явное влияние на мочевую и сексуальную функцию. Таким образом, остается существенная необходимость в методах лечения, более благоприятных для больных раком мочевого пузыря.

В 2000 насчитывалось 164100 новых случаев рака легких и бронхов, что составило 14% всех случаев постановки диагноза рака в США. Заболеваемость раком легких и бронхов значительно снизилась у мужчин, от максимума, равного 86,5 на 100000 в 1984 до 70,0 в 1996. В 1990-х темп роста заболеваемости у женщин начал замедляться. В 1996 заболеваемость у женщин составляла 42,3 на 100000.

В 2000 насчитывалось 156,900 случаев смерти от рака легких и бронхов, что составило 28% всех смертей от рака. В период 1992-1996 смертность от рака легких значительно снизилась у мужчин (-1,7% в год), в то время как показатели для женщин все еще значительно возрастали (0,9% в год). С 1987 больше женщин умирало каждый год от рака легких, чем от рака молочной железы, который более 40 лет являлся основной причиной смерти от рака у женщин. Наиболее вероятно, что снижение заболеваемости раком легких и смертности является следствием снижения уровня табакокурения в течение предыдущих 30 лет; однако снижение тенденции табакокурения у женщин отстает от такового у мужчин. Вызывает озабоченность, что, несмотря на снижение потребления табака взрослым населением, употребление табака молодежью снова растет.

Варианты лечения рака легких и бронхов определяются типом и стадией рака и включают оперативное вмешательство, лучевую терапию и химиотерапию. Для многих локализованных видов рака оперативное вмешательство обычно является предпочтительным видом лечения. Поскольку заболевание, как правило, распространилось к моменту его обнаружения, лучевую терапию и химиотерапию зачастую необходимо сочетать с оперативным вмешательством. Химиотерапия отдельно или комбинированная с облучением является предпочтительным вариантом лечения мелкоклеточного рака легких; при такой схеме лечения большой процент больных достигает ремиссии, в некоторых случаях длительной. Однако существует постоянная необходимость в эффективных лечебных и диагностических подходах к раку легких и бронхов.

По оценкам, в течение 2000 в Соединенных Штатах предполагалось возникновение 182800 новых случаев инвазивного рака молочной железы у женщин. Кроме того, в 2000 приблизительно 1400 новых случаев рака молочной железы предполагалось диагностировать у мужчин. После возрастания приблизительно на 4% в год в 1980-х заболеваемость раком молочной железы у женщин выровнялась в 1990-х

приблизительно до 110,6 случаев на 100000.

Только в США в 2000 насчитывалось 41200 смертей (40800 женщин, 400 мужчин) от рака молочной железы. Рак молочной железы занимает второе место среди смертей от рака у женщин. По самым последним данным показатели смертности значительно снизились в период 1992-1996 с наибольшим снижением у молодых женщин, и белых, и черных. Это снижение, по всей видимости, стало результатом более раннего выявления и усовершенствованного лечения.

Принимая во внимание медицинское состояние и предпочтения пациента, лечение рака молочной железы может включать секторальную резекцию (локальное удаление опухоли) и удаление подмышечных лимфатических узлов; мастэктомию (хирургическое удаление молочной железы) и удаление подмышечных лимфатических узлов; лучевую терапию; химиотерапию или гормональную терапию. Во многих случаях два или более способов используются в комбинации. Многочисленные исследования показали, что на ранних стадиях заболевания показатели длительного выживания после удаления опухоли молочной железы в сочетании с лучевой терапией аналогичны показателям выживаемости после проведения модифицированной радикальной мастэктомии. Значительные достижения методов реконструкции обеспечивают несколько вариантов реконструкции молочной железы после мастэктомии. В последнее время такая реконструкция проводится одновременно с мастэктомией.

Местное удаление протоковой карциномы *in situ* (DCIS) с достаточным количеством окружающей нормальной ткани молочной железы может предотвратить местный рецидив DCIS. Облучение молочной железы и/или тамоксифен могут снизить вероятность возникновения DCIS в оставшейся ткани молочной железы. Это важно, поскольку в отсутствие лечения DCIS может развиваться в инвазивный рак молочной железы. Тем не менее, у этих видов лечения есть серьезные побочные эффекты и осложнения. Таким образом, существует необходимость в эффективных методах лечения рака молочной железы.

В 2000 в Соединенных Штатах насчитывалось 23100 новых случаев рака яичников. Он составил 4% всех случаев рака у женщин и занял второе место среди гинекологических видов рака. В период 1992-1996 заболеваемость раком яичников была значительно снижена. В 2000 насчитывалось 14000 смертей вследствие рака яичника. Рак яичника является причиной большего числа смертей по сравнению с любым другим раком женской репродуктивной системы.

Методами лечения рака яичника являются оперативное вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия. Оперативное вмешательство, как правило, включает удаление одного или обоих яичников, фаллопиевых труб (сальпингоооариэктомию) и матки (гистерэктомию). При некоторых очень ранних опухолях удаляют только затронутый яичник, особенно у молодых женщин, желающих иметь детей. При прогрессирующем заболевании делаются попытки удалить всю область внутрибрюшинного поражения для усиления действия химиотерапии. Действительно, наблюдается значительная необходимость в эффективных методах лечения рака яичников.

В 2000 в Соединенных Штатах насчитывалось 28300 новых случаев рака поджелудочной железы. За последние 20 лет показатели рака поджелудочной железы у мужчин снизились. Показатели у женщин оставались приблизительно постоянными, но, возможно, начинают снижаться. По оценкам, в 2000 в Соединенных Штатах рак поджелудочной железы стал причиной 28200 смертей. В течение последних 20 лет наблюдается небольшое, но достоверное снижение показателей смертности у мужчин (приблизительно - 0,9% в год), в то время как среди женщин показатели незначительно возросли.

Методами лечения рака поджелудочной железы являются оперативное вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия. Эти варианты лечения могут увеличить продолжительность жизни и/или облегчить симптомы у многих пациентов, но маловероятно, что они могут излечить большинство пациентов. Имеется существенная необходимость в дополнительных терапевтических и диагностических методах в отношении рака. Они включают использование антител, вакцин и малых молекул в качестве способов лечения. Кроме того, также существует необходимость использования этих способов воздействия в качестве инструментов исследования для диагностирования, выявления, контролирования и продвижения существующего уровня техники во всех областях лечения и изучения рака.

Уже была осознана терапевтическая польза моноклональных антител (mAbs) (G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)). На сегодняшний день моноклональные антитела приняты в качестве методов лечения при пересадке органов и тканей, раке, инфекционных заболеваниях, сердечно-сосудистых заболеваниях и воспалении. Разные изотипы обладают разными эффекторными функциями. Такие различия в функции отражаются в различных пространственных структурах разных изотипов иммуноглобулинов (P.M. Alzari et al., *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988)).

Поскольку мыши удобны для иммунизации и распознают большинство человеческих антигенов как чужеродные, mAbs (моноклональные антитела) к человеческим мишеням, обладающие терапевтическим потенциалом, как правило, имеют мышинное происхождение. Однако как терапевтические средства для человека мышинные mAbs имеют неустраняемые недостатки. Их применение требует более частого введения доз, поскольку mAbs имеют более короткое время полужизни при циркуляции в крови у людей, чем человеческие антитела. К тому же немаловажно, что неоднократно введение мышинных антител приводит к тому, что иммунная система человека отвечает распознаванием белка мыши как чужеродного и образованием человеческих антимышиных антител (НАМА). Такой НАМА-ответ может приводить к

аллергической реакции и быстрому устранению мышинных антител из системы, таким образом, делая лечение мышинными антителами бесполезным. Во избежание подобных явлений были предприняты попытки создания человеческих иммунных систем у мышей.

Первоначальные попытки ставили целью создание трансгенных мышей, способных реагировать на антигены образованием антител, имеющих человеческие последовательности (см. Bruggemann et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713 (1989)), но ограничивались количеством ДНК, которое может стабильно поддерживаться доступными векторами для клонирования. Использование векторов для клонирования на основе искусственной хромосомы дрожжей (YAC) было первым шагом к введению крупных фрагментов зародышевой линии локуса Ig человека в трансгенных млекопитающих. В основном большинство генов участков V, D и J человека располагалось на одинаковом расстоянии, обнаруженном в геноме человека, а константные области человека вводились мышам при помощи YACs. Одна из таких трансгенных линий мышей известна как ксеномыши XenoMouse® и коммерчески доступна от компании Amgen Fremont, Inc. (Fremont CA).

Сущность изобретения

В изобретении предлагаются конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие анти-191P4D12 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с монометилауристатином E (ММАЕ). Данное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 45 до 52 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 70 до 77 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 116 до 125 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 49 до 54 остатка в SEQ ID NO: 8, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 72 до 74 остатка в SEQ ID NO: 8, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 111 до 119 остатка в SEQ ID NO: 8. В другом варианте воплощения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, входящие в состав конъюгата, содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую гипервариабельные участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельной области тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, задепонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером PTA-11267, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариабельной области легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, задепонированной в ATCC под номером PTA-11267, где CDR определяют согласно схеме нумерации IMGT.

Также в изобретении предлагается фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, где рак экспрессирует белок 191P4D12, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Данный рак может быть представлен раком поджелудочной железы, раком легкого, раком мочевого пузыря или раком молочной железы.

Далее изобретением предусмотрено применение конъюгата антитело-лекарственное средство по изобретению для лечения рака, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря или рак молочной железы, где рак экспрессирует белок 191P4D12.

Еще одним объектом изобретения является способ лечения рака у субъекта, включающий введение данному субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство по изобретению, где рак экспрессирует белок 191P4D12.

В данном лечении возможно сочетание введения конъюгата антитело-лекарственное средство по изобретению с облучением или введение конъюгата антитело-лекарственное средство с химиотерапевтическим средством.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. На фиг. 1 представлена кДНК и аминокислотная последовательность 191P4D12. Начальный метионин подчеркнут. Открытая рамка считывания простирается в пределах нуклеиновых кислот 264-1796, включая стоп-кодон.

Фиг. 2А, В. Нуклеиновокислотные и аминокислотные последовательности 191P4D12 антител.

Фиг. 2А. кДНК и аминокислотная последовательность тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Лидерная последовательность подчеркнута двойной линией, одной линией подчеркнута вариабельная область тяжелой цепи и пунктирной линией подчеркнута константная область человеческого IgG1.

Фиг. 2В. кДНК и аминокислотная последовательность легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Лидерная последовательность подчеркнута двойной линией, одной линией подчеркнута вариабельная область легкой цепи, пунктирной линией подчеркнута каппа константная область человека.

Фиг. 3А, В. Аминокислотные последовательности 191P4D12 антител.

Фиг. 3А. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Лидерная последовательность подчеркнута двойной линией, одной линией подчеркнута вариабельная область тяжелой цепи и пунктирной линией подчеркнута константная область человеческого IgG1.

Фиг. 3В. Аминокислотная последовательность легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Двойное подчеркивание - лидерная последовательность, одной линией подчеркнута вариабельная область легкой цепи, пунк-

тирной линией подчеркнута каппа константная область человека.

Фиг. 4А, В. Выравнивание Ha22-2(2,4)6.1 антител по отношению к зародышевой линии Ig человека.

Фиг. 4А. Выравнивание тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1 по отношению к зародышевой линии Ig человека.

Фиг. 4В. Выравнивание легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1 по отношению к зародышевой линии Ig человека.

Фиг. 5А, В. Анализ связывания Ha22-2(2,4)6.1 MAб.

Фиг. 5А: RAT-контрольные и RAT-191P4D12 клетки были окрашены Ha22-2(2,4)6.1 MAб, полученными или от гибридомы, или клеток CHO. Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты показывают, что Ha22-2(2,4)6.1 MAб, рекомбинантно экспрессированные в клетках CHO, секретируются и специфически связываются с 191P4D12, расположенным на клеточной поверхности.

Фиг. 5В: Ha22-2(2,4)6.1 MAб, полученные от гибридомы или CHO клеток, были проверены в отношении связывания с рекомбинантным очищенным внеклеточным белком 191P4D12 с помощью ELISA. Результаты показывают, что белок 191P4D12, связавшийся с Ha22-2(2,4)6.1, полученными от клеток CHO и гибридомы, был одним и тем же белком.

Фиг. 6. Определение аффинности Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с помощью FACS с использованием PC3-человек-191P4D12 клеток. Аффинность составляет 0,69 Кд.

Фиг. 7. Определение аффинности Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с помощью FACS при использовании клеток PC3-циномолгус-191P4012. Аффинность составляет 0,34 Кд.

Фиг. 8. Определение аффинности Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE методом FACS при использовании клеток PC3-крыса-191P4D12. Аффинность составляет 1,6 Кд.

Фиг. 9А-Д. Клеточная цитотоксичность, опосредованная Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE.

Фиг. 9А: анализ клеточной цитотоксичности при использовании клеток PC3-человек-191P4D12.

Фиг. 9В: анализ клеточной цитотоксичности при использовании клеток PC3-циномолгус-191P4012.

Фиг. 9С: анализ клеточной цитотоксичности при использовании клеток PC3-крыса-191P4D12.

Фиг. 9Д: анализ клеточной цитотоксичности при использовании клеток PC3-Neo.

Фиг. 10. Картирование домена Ha22-(2,4)6.1 MAб с помощью FACS.

Фиг. 11. Картирование домена Ha22-2(2,4)6.1 MAб с помощью Вестерн-блоттинга.

Фиг. 12. Оценка Ha22-2(2,4)6.1 MAб на подкожной модели формирования опухоли с использованием ксенотрансплантата рака легкого человека AG-L4 на мышах линии SCID. Результаты показывают, что 191P4D12 MAбс незначительно ингибируют рост опухоли на модели ксенотрансплантата рака легкого человека AG-L4 у мышей SCID.

Фиг. 13. Оценка Ha22-2(2,4)6.1 MAб на подкожной модели формирования опухоли с использованием ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека HPAC на мышах SCID. Результаты показывают, что 191P4D12 MAбс не ингибировали рост опухоли ксенотрансплантата поджелудочной железы человека у мышей SCID по сравнению с контрольными антителами.

Фиг. 14. Оценка Ha22-2(2,4)6.1 MAб на подкожной модели формирования опухоли с использованием ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека AG-Panc3 на мышах SCID. Результаты показывают, что 191P4D12 MAбс не ингибировали рост опухоли ксенотрансплантата поджелудочной железы человека у мышей SCID по сравнению с контрольными антителами.

Фиг. 15. Эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE на подкожных ксенотрансплантатах рака легкого человека AG-L4 у мышей линии SCID. Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов рака легкого AG-L4, подкожно-привитых бестимусным мышам, по сравнению с леченым и с нелеченым контролем.

Фиг. 16. Эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE на подкожных ксенотрансплантатах рака молочной железы человека BT-483 у мышей линии SCID. Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE значительно ингибировало рост BT-483 ксенотрансплантатов рака молочной железы, подкожно-привитых мышам SCID, по сравнению с лечеными и нелечеными контрольными ADCs.

Фиг. 17. Эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE на подкожных ксенотрансплантатах рака мочевого пузыря человека AG-B1 на мышах SCID. Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE значительно ингибировало рост AG-B1 ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря по сравнению с контрольными ADCs.

Фиг. 18. Эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE на подкожных ксенотрансплантатах рака поджелудочной железы человека AG-Panc2 на мышах SCID. Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы AG-Panc2 по сравнению с контрольными ADCs.

Фиг. 19. Эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE на подкожных трансплантатах рака легкого человека AG-Panc4 на мышах SCID. Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы AG-Panc4 по сравнению с контрольными ADCs.

Фиг. 20. Эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE в сравнительных дозировках на подкожных ксенотрансплантатах рака мочевого пузыря человека AG-B8 на мышах SCID. Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE в дозе 10 мг/кг значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов

рака мочевого пузыря AG-B8 по сравнению с Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE в дозе 5 мг/кг.

Фиг. 21A-N. Обнаружение белка 191P4D12 в образцах раковых пациентов с помощью иммуногистохимического анализа (ИНС).

Фиг. 21A, B представляют образцы рака мочевого пузыря.

Фиг. 21C, D представляют образцы рака молочной железы.

Фиг. 21E, F представляют образцы рака поджелудочной железы.

Фиг. 21G, H представляют образцы рака легких.

Фиг. 21I, J представляют образцы рака яичника.

Фиг. 21K, L представляют образцы рака пищевода.

Фиг. 21M, N представляют образцы рака головы и шеи.

Фиг. 22A, B. Представлены кривые связывания, использованные для определения аффинности Ha22-2(2,4)6.1 Mab и Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE к очищенному рекомбинантному 191P4D12 (ECD аминокислоты 1-348).

Фиг. 23A-D. Показывают связывание Ha22-2(2,4)6.1 с PC3 клетками, экспрессирующими 191P4D12 (фиг. 23A) и ортологи обезьяны циномоглус (фиг. 23B), крысы (фиг. 23C) и мыши (фиг. 23D).

Фиг. 24A-D. Показывает, что связывание Ha22-2(2,4)6.1 с двойным мутантным A76I, S91N сходно со связыванием с мышинным ортологом.

Фиг. 25. Показывает модель V-домена 191P4D12, исходя из опубликованных данных о кристаллической структуре членов семейства 191P4D12, и белки, содержащие Ig-домен, с использованием PyMOL. Показаны положения Ala-76 (испещренное точками) и Ser-91 (заштрихованное).

Фиг. 26A-C. Показывает связывание Ha22-2(2,4)6.1 с клетками, экспрессирующими V-домен (фиг. 26A), а также диким типом 191P4D12 (фиг. 26B), но не с клетками, экспрессирующими C1C2 домен, полученными ранее (фиг. 26C).

Подробное описание изобретения

План разделов.

I) Определения.

II) 191P4D12 антитела.

III) Конъюгаты антитело-лекарственное средство, в общих чертах.

III(A) Майтанзиноиды.

III(B) Ауристатины и долостатины.

III(C) Калихимицин.

III(D) Другие цитотоксические средства.

IV) Конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые связывают 191P4D12.

V) Линкерные фрагменты.

VI) Фрагмент для расширения ("расширитель").

VII) Аминокислотный фрагмент.

VIII) Спейсерный фрагмент.

IX) Молекула лекарственного средства.

X) Нагрузка лекарственным средством.

XI) Способы определения цитотоксического эффекта ADCs.

XII) Лечение рака(ов), экспрессирующего 191P4D12.

XIII) 191P4D12 в качестве мишени для терапии на основе антител.

XIV) Смеси 191P4D12 ADC.

XV) Комбинированная терапия.

XVI) Наборы/готовые изделия.

I) Определения.

Если не указано иное, все термины данной области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, использованные здесь, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники, к которой относится это изобретение. В некоторых случаях термины, имеющие обычные значения, определены здесь для ясности и/или для удобства наведения справок, и включение таких определений в описание необязательно следует интерпретировать как отражение существенных различий по сравнению с тем, что обычно подразумевается в данной области техники. Многие методы и процедуры, описанные или упомянутые здесь, являются широко распространенными и обычно применяются специалистами в данной области техники с использованием общепринятых методик, таких как, например, широко применяемые методики молекулярного клонирования, описанные в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. При необходимости процедуры, затрагивающие использование коммерчески доступных наборов и реагентов, в основном проводятся в соответствии с установленным производителем протоколом и/или параметрами, если не указано иное.

В тех случаях, когда в описании используется торговое наименование, ссылка на торговое наименование также относится к составу продукта, лекарственному средству-дженерику и активному фармацевтическому ингредиенту(ам) продукта с торговым наименованием, если контекстом не указано иное.

Термины "распространенный рак", "местно-распространенный рак", "распространившееся заболевание" и "местно-распространившееся заболевание" подразумевают виды рака, которые распространились через капсулу соответствующей ткани, и включают стадию заболевания С по системе Американской урологической ассоциации (АУА), стадию заболевания С1-С2 по системе Уитмора-Джеветта и стадию заболевания Т3-Т4 и N+ по системе TNM (опухоль, лимфатический узел, метастазирование). В целом, оперативное вмешательство не рекомендовано для пациентов с распространившимся заболеванием, и такие пациенты имеют значительно менее благоприятные перспективы по сравнению с пациентами с клинически локализованным (локализованным в рамках одного органа) раком.

Аббревиатура "AFP" относится к диметилвалин-валин-долаизолейцин-долапроин-фенилаланин-р-фенилендиамину (см. формулу XVI ниже).

Аббревиатура "ММАЕ" относится к монометил ауристатинолу Е (см. формулу XI ниже).

Аббревиатура "АЕВ" относится к сложному эфиру, полученному при взаимодействии ауристатинола Е с параацетилбензойной кислотой (см. формулу XX ниже).

Аббревиатура "АЕВВ" относится к сложному эфиру, полученному при взаимодействии ауристатинола Е с бензоилвалериановой кислотой (см. формулу XXI ниже).

Аббревиатура "ММАF" относится к довалин-валин-долаизолейцин-долапроин-фенилаланину (см. формулу XIV ниже).

Если не указано иное термин "алкил" относится к насыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему от 1 до 20 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации пределов и конкретных чисел атомов углерода в них), предпочтительно примерно от 1 до 8 атомов углерода. Примерами алкильных групп являются метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 2-метил-2-бутил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-нонил, н-децил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил и 3,3-диметил-2-бутил.

Алкильные группы, или отдельно, или как часть другой группы, могут необязательно замещаться одной или более группами, предпочтительно от 1 до 3 групп (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила и где указанные -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил и -C₂-C₈ алкинильные группы необязательно могут быть дополнительно замещенными одной или более группами, включая, но не ограничиваясь этим, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ и -CN, где каждый R" независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила.

Если не указано иначе, термины "алкенил" и "алкинил" относятся к прямой и разветвленной углеродным цепям, имеющим примерно от 2 до 20 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации пределов и конкретных чисел атомов углерода в них), предпочтительно примерно от 2 до 8 атомов углерода. Алкенильная цепь имеет по меньшей мере одну двойную связь в цепи, а алкинильная цепь имеет по меньшей мере одну тройную связь в цепи. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются этим, этилен или винил, аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил и -2,3-диметил-2-бутенил. Примеры алкинильных групп включают, но не ограничиваются этим, ацетиленовую, пропаргиловую, ацетиленоловую, пропиноловую группу, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил.

Алкенильные и алкинильные группы, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно могут замещаться одной или более группами, предпочтительно группами от 1 до 3 (причем любые дополнительные заместители выбирают из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила и где указанные -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил и -C₂-C₈ алкинильные группы могут необязательно замещаться одним или более заместителями включая, но не ограничиваясь этим, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ и -CN, где каждый R" независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила.

Если не указано иначе, термин "алкилен" относится к насыщенному углеводородному радикалу с разветвленной или прямой цепью, имеющему примерно от 1 до 20 атомов углерода (и всем комбинациям и подкомбинациям пределов и конкретных чисел атомов углерода в них), предпочтительно от 1 до 8 ато-

мов углерода, и имеющему два одновалентных радикальных центра, полученных удалением двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкилены включают, но не ограничиваются этим, метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен, декален, 1,4-циклогексилен и т.п. Алкиленовые группы, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно могут замещаться одной или более группами, предпочтительно группами от 1 до 3 (при этом любые дополнительные заместители выбирают из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила и где указанные -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенильные и -C₂-C₈ алкинильные группы необязательно могут дополнительно замещаться одним или более заместителями, включая, но не ограничиваясь этим, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ и -CN, где каждый R" независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила.

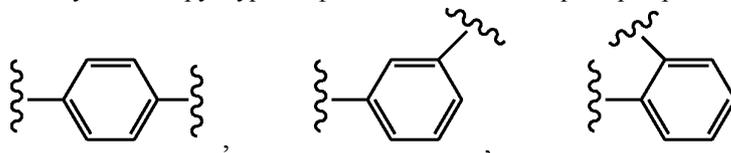
Если не указано иначе, термин "алкенилен" относится к необязательно замещенной алкиленовой группе, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры алкениленовых групп включают, например, этенилен (-CH=CH-) и пропенилен (-CH=CHCH₂-).

Если не указано иначе, термин "алкинилен" относится к необязательно замещенной алкиленовой группе, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Примеры алкиниленовых групп включают, например, ацетилен (-C≡C-), пропаргил (-CH₂C≡C-) и 4-пентинил (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).

Если не указано иначе, термин "арил" относится к одновалентному ароматическому углеводородному радикалу из 6-20 атомов углерода (и всем комбинациям и подкомбинациям пределов и конкретных чисел атомов углерода в них), полученному удалением одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической системы колец. Некоторые арильные группы представлены в структурах примеров как "Ag". Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются этим, радикалы, полученные из бензола, замещенный бензол, фенил, нафталин, антрацен, бифенил и тому подобное.

Арильная группа, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно может замещаться одной или более, предпочтительно от 1 до 5 или даже более предпочтительно от 1 до 2 групп, включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила и где указанные -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил) и -арильные группы дополнительно необязательно могут замещаться одним или более заместителями, включая, но не ограничиваясь этим, -C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -галоген, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ и -CN, где каждый R" независимо выбирают из -H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или -арила.

Если не указано иначе, термин "арилен" относится к необязательно замещенной арильной группе, которая является двухвалентной (т.е. полученной удалением двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов исходной ароматической системы колец) и может быть в орто-, мета- и пара- положениях, как показано в следующих структурах с фенилом в качестве примера арильной группы.



Типичные "-(C₁-C₈ алкилен)арил", "-(C₂-C₈ алкенилен)арил" и "-(C₂-C₈ алкинилен)арил" группы включают, но не ограничиваются этим, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилетен, фенилетен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилетен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и тому подобное.

Если не указано иначе, термин "гетероцикл" относится к моноциклической, бициклической или полициклической системе колец, имеющей от 3 до 14 кольцевых атомов (они также называются членами кольца), в которой по меньшей мере один кольцевой атом по меньшей мере в одном кольце представляет собой гетероатом, выбранный из N, O, P или S (и всем комбинациям и подкомбинациям пределов и конкретных чисел атомов углерода и гетероатомов в них). Гетероцикл может иметь от 1 до 4 гетероатомов в кольце, независимо выбранных из N, O, P или S. Один или более атомов N, S или S в гетероцикле может быть окислен. Моноциклический гетероцикл предпочтительно имеет от 3 до 7 кольцевых членов (например, от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из N, O, P или S), а

бициклический гетероцикл предпочтительно имеет от 5 до 10 кольцевых членов (например, от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из N, O, P или S). Кольцо, содержащее гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не указано иначе, гетероцикл связан с его пendantsкой группой на любом гетероатоме или атоме углерода, что дает в результате стабильную структуру.

Гетероциклы описаны в Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, главы 1, 3, 4, 6, 7, и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 по настоящее время), в частности Volumes 13, 14, 16, 19, и 28; и J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960).

Примеры "гетероциклических" групп включают, как пример и без ограничения, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталинил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азацинил, триазинил, 6H-1,2,5-тиадиазинил, 2H,6H-1,5,2-дифтазинил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хрометил, ксантенил, феноксатинил, 2H-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3H-индолил, 1H-индазолил, пуринил, 4H-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4H-карбазолил, карбазолил, β -карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперазинил, индолинил, изоиндолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензиоксазолил, охиндолил, бензоксазолинил и изатиноил. Предпочтительные "гетероциклические" группы включают, но не ограничиваются этим, бензофуранил, бензотиофенил, индолил, бензопиразолил, кумаринил, изохинолинил, пирролил, тиофенил, фуранил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, триазолил, хинолинил, пиримидинил, пиридинил, пиридонил, пиразинил, пиридазинил, изотиазолил, изоксазолил и тетразолил.

Гетероциклическая группа, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно может замещаться одной или более группами, предпочтительно группами от 1 до 2, включая, но не ограничиваясь этим, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, -галоген, $-O-(C_1-C_8)$ алкил, $-O-(C_2-C_8)$ алкенил, $-O-(C_2-C_8)$ алкинил, -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R'')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R'')_2$ и $-CN$, где каждый R' независимо выбирают из $-H$, $-C_1-C_8$ алкила, $-C_2-C_8$ алкенила, $-C_2-C_8$ алкинила или -арила и где указанный $-O-(C_1-C_8)$ алкил, $-O-(C_2-C_8)$ алкенил, $-O-(C_2-C_8)$ алкинил, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинильные и -арильные группы дополнительно необязательно могут замещаться одним или более заместителями, включая, но не ограничиваясь этим, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, -галоген, $-O-(C_1-C_8)$ алкил, $-O-(C_2-C_8)$ алкенил, $-O-(C_2-C_8)$ алкинил, -арил, $-C(O)R''$, $-OC(O)R''$, $-C(O)OR''$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR''$, $-C(O)N(R'')_2$, $-NHC(O)R''$, $-SR''$, $-SO_3R''$, $-S(O)_2R''$, $-S(O)R''$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R'')$, $-N(R'')_2$ и $-CN$, где каждый R'' независимо выбирают из $-H$, $-C_1-C_8$ алкила, $-C_2-C_8$ алкенила, $-C_2-C_8$ алкинила или арила.

В качестве примера и без ограничения, гетероциклы, связанные с углеродом, могут присоединяться в следующих положениях: положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина; положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина; положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина; положении 2, 3, 5 или 6 пиразина; положении 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тофурана, тофена, пиррола или тетрагидропиррола; положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола; положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола; положении 2 или 3 азиридина; положении 2, 3 или 4 азетидин; положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина. Более типично гетероциклы, связанные с углеродом, включают 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 5-пиридил, 6-пиридил, 3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил, 6-пиридазинил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил, 2-пиразинил, 3-пиразинил, 5-пиразинил, 6-пиразинил, 2-тиазолил, 4-тиазолил или 5-тиазолил.

В качестве примера и без ограничения, гетероциклы, связанные с азотом, могут присоединяться в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина или 1H-индазола; в положении 2 изоиндола или изоиндолина; положении 4 морфолина и положении 9 карбазола или β -карболина. Более типично гетероциклы, связанные с азотом, включают 1-азиридил, 1-азетедил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиразолил и 1-пиперидинил.

Если не указано иначе, термин "карбоцикл" относится к насыщенной или ненасыщенной неароматической моноциклической, бициклической или полициклической системе колец, имеющей от 3 до 14 атомов в кольце (и всем комбинациям и подкомбинациям пределов и конкретных чисел атомов углерода в них), где все атомы в кольце являются атомами углерода. Моноциклические карбоциклы предпочтительно имеют от 3 до 6 атомов в кольце, еще более предпочтительно 5 или 6 атомов в кольце. Бициклические карбоциклы предпочтительно имеют от 7 до 12 атомов в кольце, например, расположенных в ви-

де бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] системы, или 9 или 10 атомов в кольце, расположенных в виде бицикло [5,6] или [6,6] системы. Термин "карбоцикл" включает, например, моноциклическое карбоциклическое кольцо, объединенное с арильным кольцом (например, моноциклическое карбоциклическое кольцо, объединенное с бензольным кольцом). Карбоциклы предпочтительно имеют от 3 до 8 атомов углерода в кольце.

Карбоциклические группы, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно могут замещаться, например, одной или более группами, предпочтительно 1 или 2 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, $-O-(C_1-C_8)$ алкил, $-O-(C_2-C_8)$ алкенил, $-O-(C_2-C_8)$ алкинил, -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$, где каждый R' независимо выбирают из $-H$, $-C_1-C_8$ алкила, $-C_2-C_8$ алкенила, $-C_2-C_8$ алкинила или -арила, и где указанные $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, $-O-(C_1-C_8)$ алкил, $-O-(C_2-C_8)$ алкенил, $-O-(C_2-C_8)$ алкинил, и -арильные группы необязательно могут замещаться одним или более заместителями, включая, но не ограничиваясь этим, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, -галоген, $-O-(C_1-C_8)$ алкил, $-O-(C_2-C_8)$ алкенил, $-O-(C_2-C_8)$ алкинил, -арил, $-C(O)R''$, $-OC(O)R''$, $-C(O)OR''$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR''$, $-C(O)N(R'')_2$, $-NHC(O)R''$, $-SR''$, $-SO_3R''$, $-S(O)_2R''$, $-S(O)R''$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R'')$, $-N(R'')_2$ и $-CN$, где каждый R'' независимо выбирают из $-H$, $-C_1-C_8$ алкила, $-C_2-C_8$ алкенила, $-C_2-C_8$ алкинила или -арила.

Примеры моноциклических карбоциклических заместителей включают циклопропил, -циклобутил, -циклопентил, -1-циклопент-1-енил, -1-циклопент-2-енил, -1-циклопент-3-енил, циклогексил, -1-циклогекс-1-енил, -1-циклогекс-2-енил, -1-циклогекс-3-енил, -циклогептил, -циклооктил, -1,3-циклогексадиенил, -1,4-циклогексадиенил, -1,3-циклогептадиенил, -1,3,5-циклогептатриенил и -циклооктадиенил.

"Карбоцикло" при использовании отдельно или как части другой группы относится к необязательно замещенной карбоциклической группе, как определено выше, которая является двухвалентной (т.е. полученной удалением двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходной карбоциклической кольцевой системы).

Если контекст не указывает иное, дефис (-) обозначает точку прикрепления пendantsкой молекулы. Соответственно термин " $-(C_1-C_8)$ алкилен)арил" или " $-C_1-C_8$ алкилен(арил)" относится к радикалу C_1-C_8 алкилен, как определено в описании, в котором радикал алкилена присоединяется к пendantsкой молекуле при любом из атомов углерода радикала алкилена, а один из атомов водорода, связанный с атомом углерода радикала алкилена, замещается арильным радикалом, определенным выше.

Когда определенная группа является "замещенной", эта группа может иметь один или более заместителей, предпочтительно от одного до пяти заместителей, более предпочтительно от одного до трех заместителей, наиболее предпочтительно от одного до двух заместителей, независимо выбранных из списка заместителей. Однако группа может иметь любое число заместителей, выбранных из галогена. Также указываются группы, которые замещаются.

Подразумевается, что определение любого заместителя или переменной в конкретном положении в молекуле не зависит от его определений в другом месте этой молекулы. Понятно, что заместители и примеры замещения на соединениях данного изобретения могут быть выбраны средним специалистом в данной области техники, чтобы предоставить соединения, являющиеся химически устойчивыми, и которые могут быть легко синтезированы с помощью методов, известных в данной области техники, а также методов, излагаемых в данном описании.

"Защитные группы" при использовании в описании относятся к группам, которые селективно блокируют, или временно, или постоянно, один реакционноспособный центр в многофункциональном соединении. Подходящие для применения в настоящем изобретении гидрокси-защитные группы являются фармацевтически приемлемыми и могут нуждаться или могут не нуждаться в отщеплении от исходного соединения после введения субъекту для того, чтобы соединение стало активным. Расщепление является совершенно нормальным метаболическим процессом в организме. Гидрокси-защитные группы хорошо известны в данной области техники, смотри, *Protective Groups in Organic Synthesis* by T. W. Greene и P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3rd Edition), полностью включенную в описание путем отсылки и во всех отношениях, и включают, например, эфир (например, алкиловые эфиры и силиловые эфиры, включая, например, диалкилсилилэфир, триалкилсилилэфир, диалкилалкоксисилилэфир), сложный эфир, карбонат, карбаматы, сульфонат и фосфат защитные группы. Примеры гидрокси-защитных групп включают, но не ограничиваются этим, метиловый эфир; метоксиметиловый эфир, метилтиометиловый эфир, (фенилдиметилсилил)метоксиметиловый эфир, бензилоксиметиловый эфир, *p*-метоксibenзилоксиметиловый эфир, *p*-нитробензилоксиметиловый эфир, *o*-нитробензилоксиметиловый эфир, (4-метоксифенокс)метиловый эфир, гваяколметиловый эфир, трет-бутоксиметиловый эфир, 4-пентенилоксиметиловый эфир, силоксиметиловый эфир, 2-метоксизэтоксиметиловый эфир, 2,2,2-трихлорэтоксиметиловый эфир, бис(2-хлорэтокс)метиловый эфир, 2-(триметилсилил)этоксиметиловый эфир, ментоксиметиловый эфир, тетрагидропираниловый эфир, 1-метоксидихлорэтоксидиловый эфир, 4-метокситетрагидропираниловый эфир, 4-метокситетрагидропираниловый эфир S,S-диоксид, 1-[(2-хлор-4-метил)фенил]-4-метоксипиперидин-4-

иловый эфир, 1-(2-фторфенил)-4-метоксипиперидин-4-иловый эфир, 1,4-диоксан-2-иловый эфир, тетрагидрофураниловый эфир, тетрагидротииофураниловый эфир; замещенные этиловые эфиры, такие как 1-этоксипропиловый эфир, 1-(2-хлорэтокси)этиловый эфир, 1-[2-(триметилсилил)этоксипропиловый эфир, 1-метил-1-метоксипропиловый эфир, 1-метил-1-бензилоксиэтиловый эфир, 1-метил-1-бензилокси-2-фторэтиловый эфир, 1-метил-1-феноксипропиловый эфир, 2-триметилсилиловый эфир, трет-бутиловый эфир, аллиловый эфир, пропаргиловые эфиры, р-хлорфениловый эфир, р-метоксифениловый эфир, бензиловый эфир, р-метоксибензиловый эфир, 3,4-диметоксибензиловый эфир, триметилсилиловый эфир, триэтилсилиловый эфир, трипропилсилиловый эфир, диметилизопропилсилиловый эфир, диэтилзопропилсилиловый эфир, диметилгексилсилиловый эфир, трет-бутилдиметилсилиловый эфир, дифенилметилсилиловый эфир, бензоилформат, ацетатный эфир, хлорацетатный эфир, дихлорацетатный эфир, трихлорацетатный эфир, трифторацетатный эфир, метоксиацетатный эфир, трифенилметоксиацетатный эфир, фенилацетатный эфир, бензоатный эфир, алкил метил карбонат, алкил 9-фторенилметил карбонат, алкил этил карбонат, алкил 2,2,2-трихлорэтил карбонат, 1,1-диметил-2,2,2-трихлорэтил карбонат, алкилсульфонат, метансульфонат, бензилсульфонат, тозилат, метилен ацеталь, этилиден ацеталь и трет-бутилметилиден кеталь. Предпочтительные защитные группы представлены формулами $-R^a$, $-\text{Si}(\text{R}^a)(\text{R}^a)(\text{R}^a)$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{R}^a)$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$, и $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^a$, где R^a представляет собой C_1 - C_{20} алкил, C_2 - C_{20} алкенил, C_2 - C_{20} алкинил, $-\text{C}_1$ - C_{20} алкилен(карбоцикл), $-\text{C}_2$ - C_{20} алкилен(карбоцикл), $-\text{C}_2$ - C_{20} алкинилен(карбоцикл), $-\text{C}_6$ - C_{10} арил, $-\text{C}_1$ - C_{20} алкилен(арил), $-\text{C}_2$ - C_{20} алкенилен(арил), $-\text{C}_2$ - C_{20} алкинилен(арил), $-\text{C}_1$ - C_{20} алкилен(гетероцикл), $-\text{C}_2$ - C_{20} алкенилен(гетероцикл) или $-\text{C}_2$ - C_{20} алкинилен(гетероцикл), где указанные алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоциклический и гетероциклические радикалы, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно являются замещенными.

"Изменение нативного профиля гликозилирования" в описании означает удаление одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных в нативной последовательности 191P4D12 (или путем удаления основного участка гликозилирования или путем исключения гликозилирования химическими и/или ферментативными способами), и/или добавление одного или более участков гликозилирования, которые не присутствуют в нативной последовательности 191P4D12. В дополнение к этому фраза включает качественные изменения в гликозилировании нативных белков, затрагивающие изменение в природе и соотношении имеющихся различных углеводных фрагментов.

Термин "аналог" относится к молекуле, которая является структурно подобной или имеет сходство или имеет соответствующие свойства другой молекулы (например, белок, родственной 191P4D12). Например, аналог белка 191P4D12 может специфически связываться с антителом или Т-клеткой, которая специфически связывается с 191P4D12.

Термин "антитело" используется в самом широком смысле слова, если явно не указано иное. Таким образом, "антитело" может быть природного происхождения или может быть создано человеком, таким как моноклональные антитела, полученные с помощью общепринятой гибридомной технологии. Антитела к 191P4D12 включают моноклональные и поликлональные антитела, а также фрагменты, содержащие антигенсвязывающий домен и/или один или более гипервариабельных участков этих антител. Используемый в описании термин "антитело" относится к любой форме антитела или его фрагменту, которая специфически связывает 191P4D12 и/или проявляет желательную биологическую активность и специфически охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они специфически связывают 191P4D12 и/или проявляют желательную биологическую активность. Любые специфические антитела могут быть использованы в предоставленных в описании способах и композициях. Таким образом, в одном варианте осуществления термин "антитело" рассматривает молекулу, включающую по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи молекулы иммуноглобулина и по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи молекулы, которые в сочетании образуют специфический участок связывания антигена-мишени. В одном варианте осуществления антитело представляет собой IgG. Например, антитело представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела, пригодные в настоящих способах и композициях, могут быть получены в культуре клеток, в бактериофаге или у различных млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, коров, кроликов, коз, мышей, крыс, хомячков, морских свинок, овец, собак, кошек, обезьян, шимпанзе и человекообразных обезьян. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело настоящего изобретения представляет собой антитело млекопитающего. Для выделения первоначального антитела или создания вариантов с измененными характеристиками специфичности или avidности могут использоваться методики с применением бактериофага. Подобные методики являются общепринятыми и хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления антитело получают рекомбинантными способами, известными в данной области техники. Например, рекомбинантное антитело может быть получено путем трансфекции клетки-хозяина вектором, содержащим последовательность ДНК, кодирующую антитело. Для трансфицирования последовательности ДНК, экспрессирующей, по меньшей мере, одну VL и одну VH-область в клетке-хозяине, может использоваться один или более векторов. Типичные описания рекомбинантных способов создания и производства антител включают

Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993) и CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, самое последнее издание). Антитело настоящего изобретения может быть модифицировано рекомбинантными способами с целью увеличения эффективности антитела при опосредовании им необходимой функции. Таким образом, в объем изобретения включается, что антитела можно модифицировать путем замен, используя рекомбинантные методы. Как правило, замены являются консервативными заменами. Например, по меньшей мере одна аминокислота в константной области антитела может быть заменена на другой остаток. См., например, патент США № 5624821, патент США № 6194551, заявку № WO 9958572; и Angal, et al., Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993). Модификация аминокислот включает делеции, вставки и замещения аминокислот. В некоторых случаях такие изменения делаются с целью снижения нежелательной активности, например комплемент-зависимой цитотоксичности. Зачастую антитела помещают путем присоединения ковалентного или нековалентного вещества, обеспечивающего обнаружимый сигнал. Большое разнообразие меток и способов конъюгирования известно и подробно описано как в научной, так и в патентной литературе. Такие антитела могут быть отобраны в отношении связывания с нормальным или дефектным 191P4D12. См., например, Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press, 1996). Подходящие антитела с желаемой биологической активностью могут быть установлены с помощью исследования *in vitro*, включая, но не ограничиваясь этим, исследования пролиферации, миграции, адгезии, роста в мягком агаре, ангиогенеза, межклеточного взаимодействия, апоптоза, транспорта, передачи сигнала, и исследований *in vivo*, таких как ингибирование опухолевого роста. Предоставленные в описании антитела также могут быть пригодны в диагностических целях. Как захватывающие или не-нейтрализующие антитела, они могут быть отобраны по способности связываться со специфическим антигеном без ингибирования рецептор-связывающей или биологической активности антигена. Как нейтрализующие антитела, антитела могут быть пригодны в конкурентных анализах связывания. Они также могут использоваться для определения количества 191P4D12 или его рецептора.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "фрагмент антитела" (или просто "участок антитела") в данном контексте относится к одному или более фрагментам антитела к 191P4D12, который сохраняет способность специфически связываться с антигеном (например, 191P4D12 и его вариантами; фиг. 1). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин "антигенсвязывающий участок" антитела, включают

- (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , C_L и C_{H1} доменов;
- (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области;
- (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и C_{H1} доменов;
- (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела;
- (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из V_H домена; и
- (vi) изолированный гипервариабельный участок (CDR).

Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, с помощью рекомбинантных методов, синтетическим линкером, который обеспечивает им возможность представлять собой одну белковую цепь, в которой V_L и V_H участки спарены с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий участок" антитела. Эти фрагменты антитела получают при помощи общепринятых методов, известных специалистам в данной области техники, при этом фрагменты отбирают в отношении полезности таким же образом, как и интактные антитела.

В данном контексте любая форма "антигена" может использоваться для создания антитела, специфичного к 191P4D12. Таким образом, выявленный антиген может представлять собой единичный эпитоп, множественный эпитоп (несколько эпитопов) или полный белок отдельно или в сочетании с одним или более усиливающим иммуногенность агентом, известным в данной области техники. Выявленный антиген может представлять собой выделенный полноразмерный белок, белок клеточной поверхности (например, при иммунизации клетками, трансфицированными, по меньшей мере, участком антигена), или растворимый белок (например, при иммунизации только частью внеклеточного домена белка). Антиген может быть получен в генетически модифицированной клетке. ДНК, кодирующая антиген, может быть геномной или негеномной (например, кДНК) и кодировать по меньшей мере часть внеклеточного домена. В данном контексте термин "часть" относится к минимальному числу аминокислот или нуклеиновых кислот, в зависимости от конкретного случая, составляющему иммуногенный эпитоп представляющего интерес антигена. Могут быть использованы любые генетические векторы, подходящие для трансформации соответствующих клеток, включая, но не ограничиваясь этим, аденовирусные векторы, плазмиды и невирусные векторы, такие как катионные липиды. В одном варианте осуществления антитело, используемое в методах и композициях описания, специфически связывает по меньшей мере часть внеклеточ-

ного домена представляющего интерес 191P4D12.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предоставленные в описании, могут быть конъюгированы с "биоактивным средством". Используемый здесь термин "биоактивное средство" относится к любому синтетическому или встречающемуся в природе соединению, которое связывает антиген и/или увеличивает или опосредует необходимый биологический эффект для того, чтобы усилить действие токсинов, уничтожающих клетки. В одном варианте осуществления связывающие фрагменты, используемые в настоящем изобретении, представляют собой биологически активные фрагменты. Используемый в этом описании термин "биологически активный" относится к антителу или фрагменту антитела, способному связываться с целевым эпитопом антигена и прямо или косвенно оказывать биологическое действие. Прямые воздействия включают, но не ограничиваются этим, модулирование, стимулирование и/или ингибирование ростового сигнала, модулирование, стимулирование и/или ингибирование антиапоптотического сигнала, модулирование, стимулирование и/или ингибирование апоптотического или некротического сигнала, модулирование, стимулирование и/или ингибирование ADCC-каскада и модулирование, стимулирование и/или ингибирование CDC-каскада.

"Биспецифические" антитела также используются в настоящих способах и композициях. Используемый в этом описании термин "биспецифическое антитело" относится к антителу, как правило, моноклональному антителу, обладающему специфичностью связывания по меньшей мере к двум различным эпитопам антигена. В одном варианте осуществления эпитопы являются эпитопами одного и того же антигена. В другом варианте осуществления - это эпитопы двух различных антигенов. В данной области техники известны методы создания биспецифических антител. Например, биспецифические антитела можно получить рекомбинантно путем коэкспрессии пар легкой и тяжелой цепей двух иммуноглобулинов. См., например, Milstein et al., *Nature* 305:537-39 (1983). Альтернативно биспецифические антитела можно получить с помощью химической связи. См., например, Brennan, et al., *Science* 229:81 (1985). Bispecific antibodies include bispecific antibody fragments. См., например, Hollinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48 (1993), Gruber, et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

В частности, моноклональные антитела, описанные в этом документе, включают "химерные" или гибридные антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям антител, полученных из определенных видов или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остаток цепи (цепей) является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям антител, полученных из других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, так же, как и фрагменты таких антител, при условии, что они специфически связывают целевой антиген и/или проявляют желательную биологическую активность (патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

Термин "химиотерапевтическое средство" относится ко всем химическим соединениям, эффективно ингибирующим рост опухоли. Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие соединения, например азотистые иприты, соединения этиленмина и алкилсульфонаты; антиметаболиты, например фолиевую кислоту, антагонисты пурина или пиримидина; ингибиторы митоза, например анти tubулиновые препараты, такие как винкаалкалоиды, ауристатины и производные подофиллотоксина; цитотоксические антибиотики; соединения, повреждающие ДНК или препятствующие экспрессии или репликации ДНК, например вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК; антагонисты рецепторов ростовых факторов. Кроме этого, химиотерапевтические средства включают цитотоксические средства (указанные в данном документе), антитела, биологические молекулы и малые молекулы.

Термин "соединение" относится к и включает собственно химическое соединение, а также, прописано четко или нет, и если они прямо не исключены контекстом, включает следующее: аморфные и кристаллические формы соединения, включая полиморфные формы, где эти формы могут являться частью смеси или быть в чистом виде; свободные кислотные и свободные основные формы соединения, которые, как правило, представляют собой формы, показанные в виде структурных формул, представленных в этом описании; изомеры соединения, относящиеся к оптическим изомерам и таутомерным изомерам, где оптические изомеры включают энантиомеры и диастереомеры, хиральные изомеры и нехиральные изомеры, и оптические изомеры включают изолированные оптические изомеры, а также смеси оптических изомеров, включая рацемические и нерацемические смеси; где изомер может быть в изолированной форме или в смеси с одним или более другими изомерами; изотопы соединения, включая дейтерий- и тритий-содержащие соединения, и включая соединения, содержащие радиоизотопы, включая терапевтически и диагностически эффективные радиоизотопы; мультимерные формы соединения, включая димерные, тримерные, и т.д. формы; соли соединения, предпочтительно фармацевтически приемлемые соли, включая соли присоединения кислоты и соли присоединения основания, включая соли, имеющие органические противоионы и неорганические противоионы, и включая цвиттерионные формы, в которых, если соединение связано с двумя или более противоионами, два или более противоиона могут быть одинаковыми или разными; и сольваты соединения, включая гемисольваты, моносольтваты, дисольваты и т.д., включая органические сольваты, неорганические сольваты, указанные неорганические сольваты, включая гидраты; в которых, если соединение связано с двумя или более молекулами растворителя, две

или более молекулы растворителя могут быть одинаковыми или разными. В некоторых случаях ссылка, сделанная в описании на соединение изобретения, будет включать прямую ссылку на одну из вышеупомянутых форм, например соли и/или сольваты; однако эта ссылка представляет собой только акцентирование внимания и не должна рассматриваться как исключаящая другие из вышеупомянутых форм, установленных выше.

В данном контексте термин "консервативная замена" относится к замещениям аминокислот, известным специалистам в данной области техники, и которые, как правило, могут быть сделаны без изменения биологической активности получаемой молекулы. В общем, специалистам в данной области техники понятно, что замещения единичных аминокислот в несущественных участках полипептида незначительно изменяют биологическую активность (см., например, Watson, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Такие приводимые в качестве примера замещения предпочтительно делаются в соответствии с представленными в табл. II и табл. III (a-b). Например, такие изменения включают замещение любого изолейцина (I), валина (V) и лейцина (L) на любую другую из этих гидрофобных аминокислот; глутаминовой кислоты (E) на аспарагиновую кислоту (D) и наоборот; глутамин (Q) на аспарагин (N) и наоборот; и серина (S) на треонин (T) и наоборот. Другие замещения также могут рассматриваться как консервативные, в зависимости от окружения определенной аминокислоты и ее роли в третичной структуре белка. Например, глицин (G) и аланин (A) часто могут быть взаимозаменяемыми, также как аланин (A) и валин (V). Метионин (M), являющийся относительно гидрофобным, зачастую может быть заменен лейцином и изолейцином, иногда валином. Лизин (K) и аргинин (R) часто являются взаимозаменяемыми в местоположениях, в которых важным свойством аминокислотного остатка является его заряд, а различие pK этих двух аминокислотных остатков не являются значительными. Также другие изменения могут считаться "консервативными" в определенной окружающей обстановке, например табл. III (a) в описании; страницы 13-15 "Biochemistry" 2nd ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem 1995 May 19; 270(20): 11882-11886). Другие замещения также являются допустимыми и могут быть определены эмпирически или согласно известным консервативным замещениям.

Термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает экспрессионную активность клеток, функции клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин включает радиоактивные изотопы, химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты. Примеры цитотоксических средств включают, но не ограничиваются этим, ауристатин (например, ауристатин E, ауристатин F, ММАЕ и ММАФ), аурамицины, майтанзиноиды, ризин, А-цепь ризина, комбрестатин, дуокармицины, доластатин, доксорубин, даунорубин, таксол, цисплатин, сс1065, бромистый этидий, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, дигидрокси антрацин дион, актиномицин, дифтерийный токсин, эндотоксин *Pseudomonas* (PE) A, PE40, абрин, А-цепь абрина, А-цепь модеккина, альфа-сарцин, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин, курицин, кротин, калихимидин, ингибитор *Saronaia officinalis*, глюкокортикоиды и другие химиотерапевтические средства, а также радиоизотопы, такие как At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² или ²¹³P, ³²P и радиоактивные изотопы Lu, включая Lu¹⁷⁷. Антитела также могут быть конъюгированы с ферментом, активирующим противоопухолевое пролекарственное средство, способным превращать пролекарственное средство в его активную форму.

При использовании в описании термин "диантитела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, фрагменты которых содержат варибельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с варибельным доменом легкой цепи (V_L) в одну полипептидную цепь (V_H-V_L). При использовании линкера, слишком короткого для обеспечения соединения двух доменов одной цепи, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антиген-связывающих сайта. Диантитела описаны более полно, например, в EP 404097, WO 93/11161 и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

Термин "истощение", в контексте воздействия 191P4D12-связывающего средства на 191P4D12-экспрессирующие клетки, относится к уменьшению количества или устранению 191P4D12-экспрессирующих клеток.

Термин "продукт гена" используется в данном описании для обозначения пептида/белка или мРНК. Например, "продукт гена изобретения" в этом описании иногда называется "раковая аминокислотная последовательность", "раковый (злокачественный) белок", "белок злокачественных новообразований, перечисленных в табл. I", "раковая мРНК", "мРНК злокачественных новообразований, перечисленных в табл. I", и т.д. В одном варианте осуществления раковый белок кодируется нуклеиновой кислотой, представленной на фиг. 1. Раковый белок может быть фрагментом или, альтернативно, полноразмерным белком, кодируемым нуклеиновыми кислотами, представленными на фиг. 1. В одном варианте осуществления раковая аминокислотная последовательность используется для определения идентичности или сходства последовательности. В другом варианте осуществления последовательности представляют собой встречающиеся в природе аллельные варианты белка, кодируемого нуклеиновой кислотой, представленной на фиг. 1. В другом варианте осуществления последовательности представляют собой варианты по-

следовательностей, описанные в этом документе в дальнейшем.

В настоящих способах и композициях используется "гетероконъюгат антитела". В данном контексте термин "гетероконъюгат антитела" относится к двум ковалентно связанным антителам. Такие антитела могут быть получены с помощью методов, известных в химии белкового синтеза, включая использование веществ, образующих поперечные связи. См., например, патент США № 4676980.

Термин "гомолог" относится к молекуле, которая проявляет гомологию с другой молекулой, например благодаря наличию последовательностей химических остатков, одинаковых или аналогичных в соответствующих положениях.

В одном варианте осуществления предоставленное в этом описании антитело представляет собой "человеческое антитело". В данном контексте термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором практически полные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи, включая гипервариабельные участки (CDRs), происходят из генов человека. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела создаются с помощью триомной технологии, технологии В-клеток человека (см., например, Kozbor, et al., *Immunol. Today* 4: 72 (1983), технологии трансформации EBV (см., например, Cole et al., *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* 77-96 (1985)) или с использованием фагового дисплея (см., например, Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)). В отдельном варианте осуществления человеческие антитела вырабатываются в трансгенных мышах. Методы создания таких частично или полностью человеческих антител известны в данной области техники, и могут использоваться любые подобные методы. В частности, в соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления полная последовательность человеческого антитела получена в трансгенной мышши, созданной для экспрессии генов тяжелой и легкой цепей антитела человека. Приводимое в качестве примера описание создания трансгенных мышшей, продуцирующих человеческие антитела, можно найти в заявке № WO 02/43478 и патенте США 6657103 (Abgenix). В-клетки трансгенных мышшей, продуцирующие желаемое антитело, затем могут быть слиты для получения гибридных клеточных линий, предназначенных для постоянной выработки антител. См., например, патенты США № 5569825; 5625126; 5633425; 5661016 и 5545806; и Jakobovits, *Adv. Drug Del. Rev.* 31:33-42 (1998); Green, et al., *J. Exp. Med.* 188:483-95 (1998).

В данном контексте термин "гуманизированное антитело" относится к формам антител, содержащим последовательности нечеловеческих (например, мышшиных) антител, а также человеческих антител. Такие антитела представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В большинстве случаев гуманизированное антитело будет содержать существенную часть по меньшей мере одного и в основном двух вариабельных доменов, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина и все или практически все FR-участки представляют собой такие участки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также необязательно будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно человеческого иммуноглобулина. См., например, Cabilly патент США № 4816567; Queen et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; и *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Oxford University Press 1996).

Термин "ингибирует" или "ингибирование", использованный в данном описании, подразумевает уменьшение измеряемого количества или полное предотвращение.

Фразы "изолированный (выделенный)" или "биологически чистый" относятся к веществу, которое в значительной степени или в основном не содержит компонентов, которые обычно сопутствуют веществу в его естественном состоянии. Таким образом, выделенные пептиды в соответствии с изобретением предпочтительно не содержат веществ, обычно связанных с пептидами в их окружающей среде *in situ*. Например, полинуклеотид называется "выделенным", когда он в значительной степени отделен от "загрязняющих" полинуклеотидов, которые соответствуют или комплементарны генам, отличным от генов 191P4D12, или от генов, кодирующих полипептиды, отличных от продукта гена 191P4D12 или его фрагментов. Специалист в данной области может легко применять методы выделения нуклеиновых кислот для получения изолированного 191P4D12 полинуклеотида. Например, белок называется "выделенным", когда физические, механические или химические методы применяются для отделения белков 191P4D12 от клеточных компонентов, обычно связанных с белком. Специалист в данной области может легко применять стандартные методы очистки для получения выделенного белка 191P4D12. Альтернативно выделенный белок можно получить с помощью химических методов.

Подходящие "метки" включают радиоактивные вещества, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, магнитные частицы и тому подобное. Патенты, сообщающие об использовании таких меток, включают патенты США № 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149 и 4366241. Кроме того, антитела, предоставленные в этом описании, могут использоваться в качестве антигенсвязывающего компонента флюоротел (fluorobodies). См. например, Zeytun et al., *Nat. Biotechnol.* 21:1473-79 (2003).

Термин "млекопитающее" относится к любому организму, классифицированному как млекопитающее, включая мышшей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей и человека. В одном варианте осуществления изобретения млекопитающее является мышью. В другом варианте осуществления изобретения млекопитающее является человеком.

Термины "метастатический рак" и "метастатическая болезнь" подразумевают злокачественные новообразования, которые распространились в регионарные лимфатические узлы или в отдаленные участки тела и включают стадию D заболевания по системе AUA и стадию T_xN_xM⁺ по системе TNM.

Термины "модулятор", или "испытываемое соединение", или "потенциальное лекарственное средство", или их грамматические эквиваленты в данном контексте описывают любую молекулу, например белок, олигопептид, небольшую органическую молекулу, полисахарид, полинуклеотид и т.д., которую необходимо проверить в отношении ее способности прямо или косвенно изменять раковый фенотип или экспрессию раковой последовательности, например последовательности нуклеиновой кислоты или белка, или эффекты раковых последовательностей (например, передачу сигнала, экспрессию генов, белковое взаимодействие и т.д.). В одном аспекте модулятор будет нейтрализовать воздействие ракового белка изобретения. Под термином "нейтрализовать" подразумевается, что активность белка ингибируется или блокируется наряду с последующим воздействием на клетку. В другом аспекте модулятор будет нейтрализовать действие гена и его соответствующего белка путем нормализации уровней указанного белка. В предпочтительных вариантах осуществления модуляторы изменяют профили экспрессии или профили экспрессии предоставленных в этом описании нуклеиновых кислот или белков или нижележащие эффекторные пути. В одном варианте осуществления модулятор подавляет раковый фенотип, например до характерного признака нормальной ткани. В другом варианте осуществления модулятор вызывает раковый фенотип. Как правило, проводится исследование множества смесей параллельно с разными концентрациями средства для получения дифференцированного ответа на различные концентрации. Как правило, одна из этих концентраций служит негативным контролем, т.е. при нулевой концентрации или концентрации ниже уровня обнаружения.

Модуляторы, потенциальные лекарства или испытываемые соединения включают многочисленные химические классы, хотя обычно они представляют собой органические молекулы, предпочтительно небольшие органические соединения, имеющие молекулярную массу более 100 и менее чем около 2,500 Дальтон. Предпочтительными небольшими молекулами являются молекулы менее 2000, или менее 1500, или менее 1000, или менее 500 Да. Потенциальные средства содержат функциональные группы, необходимые для структурного взаимодействия с белками, в частности водородного связывания, и, как правило, включают, по меньшей мере, amino-, карбонильную, гидроксильную или карбоксильную группу, предпочтительно по меньшей мере две функциональные химические группы. Потенциальные средства часто содержат циклический углерод или гетероциклические структуры и/или ароматические или полиароматические структуры, замещенные одной или более из вышеуказанных функциональных групп. Модуляторы также содержат биомолекулы, такие как пептиды, сахараиды, жирные кислоты, стероиды, пурины, пиримидины, производные, структурные аналоги или их комбинации. Особенно предпочтительными являются пептиды. Один класс модуляторов представляет собой пептиды, содержащие, например, приблизительно от пяти до 35 аминокислот, предпочтительно примерно от 5 до 20 аминокислот и особенно предпочтительно примерно от 7 до 15 аминокислот. Предпочтительно раковый модулирующий белок является растворимым, включает не-трансмембранный участок и/или имеет N-концевой Cys для улучшения растворимости. В одном варианте осуществления С-конец фрагмента сохраняется как свободная кислота и N-конец представляет собой свободный амин для улучшения соединения, т.е. к цистеину. В одном варианте осуществления раковый белок изобретения конъюгируют с иммуногенным средством, как уже обсуждалось. В одном варианте осуществления раковый белок конъюгируют с BSA. Пептиды изобретения, например, предпочтительных длин могут быть связаны между собой или с другими аминокислотами для создания более длинного пептида/белка. Модулирующие пептиды могут быть гидролизатом природных белков, как описано выше, случайных пептидов или "смещенных" случайных пептидов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения модуляторы на основе пептида/белка представляют собой антитела и их фрагменты, как указано в этом документе.

Термин "моноклональное антитело" в данном описании относится к антителу, полученному из популяции в основном гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными на отдельный эпитоп антигена. Напротив, препараты обычных (поликлональных) антител, как правило, включают большое число антител, направленных против (или специфичных к) различным эпитопам. В одном варианте осуществления поликлональное антитело содержит множество моноклональных антител с различной специфичностью эпитопа, аффинностью или авидностью в пределах отдельного антигена, который содержит множественные антигенные эпитопы. Модификатор "моноклональное" указывает характер антитела, полученного в основном из гомогенной популяции антител, что следует рассматривать как обязательное получение антитела каким-либо определенным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены методом гибридомы, впервые описанным Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), или могут быть созданы методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методов, описанных в Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991). Например, эти моноклональные антитела

будут обычно связываться с Кд, равной по меньшей мере приблизительно 1 мкМ, еще чаще по меньшей мере приблизительно 300 нМ, обычно по меньшей мере приблизительно 30 нМ, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 нМ, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 3 нМ или лучше, что обычно определяется методом ELISA.

"Фармацевтический эксципиент" включает вещество, такое как адъювант, носитель, средство, регулирующее pH и буферное средство, средства, регулирующие тоничность, увлажняющие средства, консерванты и тому подобное.

"Фармацевтически приемлемый" относится к нетоксичной, инертной и/или композиции, которая физиологически совместима с человеком или другими млекопитающими.

Термин "полинуклеотид" подразумевает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований или пар оснований, или рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов, или модифицированной формы любого типа нуклеотида, и включает одно- и двухцепочечные формы ДНК и/или РНК. В данной области техники этот термин часто используется взаимозаменяемым образом с термином "олигонуклеотид". Полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность, раскрытую в этом описании, в которой тимидин (Т), как показано, например, на фиг. 1, также может быть урацилом (У); это определение имеет отношение к различиям между химическими структурами ДНК и РНК, в частности наблюдению, что одним из четырех основных оснований в РНК является урацил (У) вместо тимидина (Т).

Термин "полипептид" подразумевает полимер, состоящий по меньшей мере приблизительно из 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислот. На всем протяжении подробного описания используются стандартные трехбуквенные или однобуквенные обозначения аминокислот. В данной области техники этот термин часто используется взаимозаменяемым образом с термином "пептид" или "белок".

"Рекомбинантная" молекула ДНК или РНК представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая подвергалась молекулярным манипуляциям *in vitro*.

В данном контексте термин "одноцепочечный Fv", или "scFv", или "одноцепочечное" антитело относится к фрагментам антитела, содержащим V_H и V_L домены антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, Fv полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, который дает возможность sFv образовать желаемую структуру для связывания антигена. См. обзорные материалы по sFv в Pluckthun, *The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg и Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

В данном контексте термин "специфический", "специфически связывается" и "связывает специфично" относится к селективному связыванию антитела с эпитопом антигена-мишени. Антитела могут быть проверены в отношении специфичности связывания путем сравнения связывания с соответствующим антигеном со связыванием с несоответствующим антигеном или антигенной смесью при заданном наборе условий. В том случае, если антитело связывается с соответствующим антигеном по меньшей мере в 2, 5, 7 и предпочтительно в 10 раз больше, чем с несоответствующим антигеном или смесью антигенов, оно считается специфичным. В одном варианте осуществления специфическое антитело представляет собой антитело, которое связывает только 191P4D12 антиген, но не связывается с несоответствующим антигеном. В другом варианте осуществления специфическое антитело представляет собой антитело, которое связывает человеческий 191P4D12 антиген, но не связывает нечеловеческий 191P4D12 антиген с 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большей гомологией аминокислотной последовательности с 191P4D12 антигеном. В другом варианте осуществления специфическое антитело представляет собой антитело, которое связывает человеческий 191P4D12 антиген и связывает мышинный 191P4D12 антиген, но с более высокой степенью связывания человеческого антигена. В другом варианте осуществления специфическое антитело представляет собой антитело, которое связывает человеческий 191P4D12 антиген и связывает антиген 191P4D12 приматов, но с более высокой степенью связывания человеческого антигена. В другом варианте осуществления специфическое антитело связывается с человеческим 191P4D12 антигеном и любым нечеловеческим 191P4D12 антигеном, но с более высокой степенью связывания человеческого антигена или любой их комбинации.

В данном контексте "лечить", или "терапевтический", или грамматически родственные термины относятся к любому улучшению любого следствия болезни, такому как увеличение выживаемости, меньшее количество смертельных случаев и/или уменьшение побочных эффектов, которые являются "побочными продуктами" альтернативного терапевтического воздействия; следует понимать, что полное устранение болезни является предпочтительным, но, тем не менее, не является требованием к акту лечения.

Термин "вариант" относится к молекуле, которая демонстрирует отличие от описанного типа или нормы, такой как белок, имеющий один или более различных аминокислотных остатков в соответствующей позиции(ях) специально описанного белка (например, 191P4D12 белка, показанного на фиг. 1.) Аналог представляет собой пример варианта белка. Сплайс-изоформы и одиночные нуклеотидные полиморфизмы (SNPs) являются дополнительными примерами вариантов.

"191P4D12 белки" и/или "191P4D12-родственные белки" изобретения включают белки, в частности, установленные в описании (см. фиг. 1), также как и аллельные варианты, варианты с консервативными заменами, аналоги и гомологи, которые могут быть выделены/созданы и охарактеризованы без излишнего экспериментирования, следуя описанным здесь или легко доступным в данной области техники мето-

дам. Кроме того, включаются гибридные белки, объединяющие части различных 191P4D12 белков или их фрагментов, а также гибридные белки 191P4D12 белка и гетерологичного полипептида. Такие 191P4D12 белки в совокупности относятся к 191P4D12-родственным белкам, белкам изобретения или 191P4D12. Термин "191P4D12-родственный белок" относится к полипептидному фрагменту или последовательности белка 191P4D12 из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более, чем 25 аминокислот; или по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 или более аминокислот.

II) 191P4D12 антитела.

Другой аспект изобретения предоставляет антитела, которые связываются с 191P4D12-родственными белками (см. фиг. 1). В одном варианте осуществления антитело, связывающееся с 191P4D12-родственными белками, представляет собой антитело, которое специфически связывается с белком 191P4D12, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Антитело, которое специфически связывается с белком 191P4D12, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, включает антитела, которые могут связываться с другими 191P4D12-родственными белками. Например, антитела, связывающие белок 191P4D12, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, могут связывать 191P4D12-родственные белки, такие как варианты 191P4D12 и их гомологи и аналоги.

191P4D12 антитела изобретения являются особенно удобными при прогностических исследованиях рака (см., например, табл. I), визуализации и в терапевтических методах. Подобным образом, такие антитела используются при лечении и/или прогнозировании рака толстой кишки и других видов рака, в тех случаях когда 191P4D12 также экспрессируется или сверхэкспрессируется при этих других видах рака. Кроме того, антитела, экспрессируемые внутри клетки (например, одноцепочечные антитела), находят терапевтическое применение при лечении видов рака, в которых наблюдается экспрессия 191P4D12, таких как прогрессирующий или метастатический колоректальный рак или другие распространенные или метастатические виды рака.

Различные способы получения антител, в частности моноклональных антител, хорошо известны в данной области техники. Например, антитела можно получить путем иммунизации подходящего млекопитающего-хозяина с использованием 191P4D12-родственного белка, пептида или фрагмента в изолированной форме или в форме иммуноконъюгата (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Кроме того, также могут использоваться гибридные белки 191P4D12, такие как 191P4D12 GST-гибридный белок. В отдельном варианте осуществления получают GST-гибридный белок, содержащий всю или большую часть аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 1, и затем используют в качестве иммуногена для создания соответствующих антител. В другом варианте осуществления 191P4D12-родственный белок был синтезирован и использован в качестве иммуногена.

Кроме того, для вызова иммунного ответа к закодированному иммуногену используются известные в данной области методы иммунизации "голой" ДНК (с или без очищенного белка, родственного 191P4D12, или 191P4D12-экспрессирующими клетками) (см. для обозрения Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

Аминокислотную последовательность белка 191P4D12, как показано на фиг. 1, можно проанализировать, чтобы выбрать специфические участки белка 191P4D12 для создания антител. Например, для определения гидрофильных участков в структуре 191P4D12 используется анализ гидрофобности и гидрофильности аминокислотной последовательности 191P4D12. Участки белка 191P4D12, обнаруживающие иммуногенную структуру, так же как и другие участки и домены, могут быть без труда идентифицированы с использованием различных других методов, известных в данной области техники, таких как Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz или анализ Jameson-Wolf. Профили гидрофильности могут быть получены с использованием метода Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828. Профили гидрофобности могут быть получены с использованием метода Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132. Профили содержания (%) доступных остатков могут быть получены с использованием метода Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Профили средней подвижности могут быть получены с использованием метода Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Профили бета-изгибов могут быть получены с использованием метода Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. Таким образом, каждый участок, идентифицированный при помощи любого из этих программ или способов, входит в объем настоящего изобретения. Предпочтительные методы создания антител к 191P4D12 далее проиллюстрированы посредством приведенных в этом описании примеров. Способы получения белка или полипептида для использования в качестве иммуногена хорошо известны в данной области техники. Также хорошо известны в данной области техники способы получения иммуногенных конъюгатов белка с носителем, таким как BSA, KLH или другой белок-носитель. При некоторых условиях используется прямая конъюгация, например используются карбодимидные реагенты; в других случаях эффективны сшивающие реагенты такие, как поставляемые Pierce Chemical Co., Rockford, IL. Введение иммуногена 191P4D12 часто произ-

водится путем инъекции на протяжении подходящего периода времени и с использованием подходящего адьюванта, как известно в данной области техники. Во время проведения режима иммунизации для определения достаточности образования антител проводится титрование антител.

Моноклональные антитела к 191P4D12 могут быть получены различными способами, хорошо известными в данной области техники. Например, иммортализованные клеточные линии, секретирующие целевое моноклональное антитело, получают с использованием стандартной гибридомной технологии по Kohler и Milstein или модификаций, иммортализирующих антитело-продуцирующие В клетки, что хорошо известно. Иммортализованные клеточные линии, секретирующие целевые антитела, отбирают с помощью иммуноанализа, в котором антиген представляет собой 191P4D12-родственный белок. Когда определена подходящая иммортализованная клеточная культура, клетки можно размножить и получить антитела или из культур *in vitro* или из асцитной жидкости.

Антитела или фрагменты изобретения также могут быть получены рекомбинантными способами. Участки, специфично связывающиеся с целевыми участками белка 191P4D12, также могут быть получены в случае химерных антител или антител с привитым гипервариабельным участком (CDR), происходящих от многих видов. Кроме того, могут быть получены гуманизированные или человеческие антитела к 191P4D12, которые являются предпочтительными для использования в терапевтических целях. Способы гуманизации мышинных и других нечеловеческих антител путем замещения одного или более нечеловеческих CDRs на соответствующие последовательности человеческих антител хорошо известны (см., например, Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239: 1534-1536). См. также Carter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 and Sims et al., 1993, J. Immunol. 151: 2296.

В предпочтительном варианте осуществления антитела настоящего изобретения содержат полностью человеческие антитела к 191P4D12 (191P4D12 MAbs). Различные методы в данной области техники предоставляют способы получения полностью человеческих 191P4D12 MAbs. Например, предпочтительный вариант осуществления предусматривает технологии с использованием трансгенных мышей, инактивированных в отношении выработки антител, созданных с человеческими локусами тяжелых и легких цепей, называемых ксеномыши (Xenomouse) (Amgen Fremont, Inc.). Приводимое в качестве примера описание создания трансгенных мышей, продуцирующих человеческие антитела, можно найти в США 6657103. См. также патенты США № 5569825; 5625126; 5633425; 5,661016 и 5545806; Mendez, et al., Nature Genetics, 15: 146-156 (1998); Kellerman, S.A. & Green, L.L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593-597 (2002).

Кроме того, человеческие антитела изобретения могут быть получены с использованием мышей HuMAb (Medarex, Inc.), которые содержат минолокусы генов иммуноглобулинов человека, кодирующие неперестроенные последовательности тяжелых цепей (мю и гамма) и каппа легкой цепи иммуноглобулинов человека, вместе с целевыми мутациями, инактивирующими эндогенные локусы мю и каппа цепей (см. например, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859).

В другом варианте осуществления полностью человеческие антитела изобретения могут быть получены с использованием мышей, несущих последовательности иммуноглобулинов человека в виде трансгенов и на трансхромосомах, таких как мыши, несущие трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, упоминаемые в этом описании как "KM мыши", описаны в Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 и PCT публикации WO 02/43478 to Tomizuka, et al.

Человеческие моноклональные антитела изобретения также могут быть приготовлены с использованием методов фагового дисплея в случае скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие методы фагового дисплея выделения человеческих антител разработаны в данной области техники. См. например: патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698 Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717 Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197 McCafferty et al.; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 Griffiths et al.

Человеческие моноклональные антитела изобретения также могут быть приготовлены с использованием мышей SCID, у которых иммунные клетки человека преобразованы так, что иммунизация может вызвать образование человеческих антител. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767 Wilson et al.

В предпочтительном варианте осуществления MAbs 191P4D12 изобретения содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного Ha22-2(2,4)6.1, полученного с помощью гибридомы, зарегистрированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под инвентарным № PTA-11267 (см. фиг. 3), или вариабельные участки тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям вариабельных участков тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства MAbs 191P4D12 изобретения. Вариабельный участок тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1 состоит из аминокислотной последовательности в пределах от 20-го E остатка до 136-го S остатка SEQ ID NO: 7, и вариабельный участок легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 23-го D остатка до 130-го R остатка SEQ ID NO: 8. В качестве константного участка антитела изобретения может быть выбран любой подкласс константного участка. В одном варианте осуществления могут быть использованы константный участок человеческого IgG1 в качестве константного участка

тяжелой цепи и константный участок человеческого Ig каппа в качестве константного участка легкой цепи.

Например, изобретение предоставляет выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащую вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, в котором

(а) вариабельный участок тяжелой цепи включает в себя аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, представленной на фиг. 3; и

(б) вариабельный участок тяжелой цепи включает в себя аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, представленной на фиг. 3.

В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут быть на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичны последовательностям V_H и V_L , представленным на фиг. 3.

В другом варианте осуществления изобретение предоставляет выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащую гуманизированный вариабельный участок тяжелой цепи и гуманизированный вариабельный участок легкой цепи, в котором

(а) вариабельный участок тяжелой цепи включает в себя гипервариабельные участки (CDRs), имеющие аминокислотные последовательности вариабельных участков тяжелой цепи CDRs, представленных на фиг. 3;

(б) вариабельный участок тяжелой цепи включает в себя CDRs, имеющие аминокислотные последовательности вариабельных участков легкой цепи CDRs, представленных на фиг. 3.

Разработанные антитела изобретения включают те, в которых были произведены изменения каркасных остатков внутри V_H и/или V_L (например, для улучшения свойств антитела). Обычно такие изменения каркаса делаются с целью снижения иммуногенности антитела. Например, один подход представляет собой "мутацию к первоначальному виду" одного или более каркасных остатков на соответствующую зародышевую последовательность. Конкретнее антитело, подвергнувшееся соматической мутации, может содержать каркасные остатки, отличающиеся от зародышевой последовательности, на основе которой получено антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, на основе которой получено антитело. Для возвращения последовательностей каркасных участков к их зародышевой конфигурации соматические мутации могут быть "мутированы к первоначальному виду" последовательности зародышевой линии путем, например, сайт-специфического мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза (например, "мутированы к первоначальному виду" заменой лейцина на метионин). Такие "мутированные к первоначальному виду" антитела также рассматриваются изобретением.

Другой тип модификаций каркаса затрагивает мутирование одного или более остатков внутри каркасного участка, или даже внутри одного или более CDR участков, для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы посредством этого снизить возможную иммуногенность антитела. Этот подход также называется "деиммунизация" и более подробно описан в патентной публикации США № 2003/0153043 Carr et al.

В дополнение или альтернативно модификациям внутри каркасных или CDR участков, антитела изобретения могут быть сконструированы так, чтобы включать модификации внутри Fc участка, обычно для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность. Кроме того, 191P4D12 MAb изобретения может быть модифицировано химически (например, к антителу может быть присоединен один или более химических фрагментов) или быть модифицировано для изменения его гликозилирования, снова для изменения одного или более функциональных свойств MAb. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже.

В одном варианте осуществления шарнирный участок CH1 модифицирован таким образом, что число остатков цистеина в шарнирном участке изменено, например увеличено или уменьшено. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425 Bodmer et al. Число остатков цистеина в шарнирном участке CH1 изменено, например, для облегчения объединения легкой и тяжелой цепей или увеличения или уменьшения стабильности 191P4D12MAb.

В другом варианте осуществления Fc шарнирный участок антитела мутирован для того, чтобы снизить биологическое время полужизни 191P4D12 MAb. Конкретнее одну или более аминокислотных мутаций вводят в участок зоны взаимодействия CH2-CH3 доменов Fc-шарнирного фрагмента так, что связывание антитела с белком Staphylococcal protein A (SpA) ухудшено по сравнению со связыванием нативного Fc-шарнирного домена с SpA. Этот подход более подробно описан в патенте США № 6165745 Ward et al.

В другом варианте осуществления 191P4D12 MAb модифицировано для увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, мутации могут быть введены, как описано в патенте США № 6277375 Ward. Альтернативно, для увеличения биологического времени полужизни антитело может быть изменено внутри CH1 или CL участка так, чтобы содержать эпитоп, свя-

звующий рецептор "спасатель", взятый из двух петель CH2 домена Fc участка IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 Presta et al.

В следующих вариантах осуществления Fc участок изменен путем замещения по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторной функции(й) 191P4D12 MAb. Например, одна или более аминокислот, выбранных из специфических аминокислотных остатков, может быть замещена другим аминокислотным остатком, так что антитело будет иметь измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохранит антигенсвязывающую способность исходного антитела. Например, эффекторным лигандом, аффинность к которому изменяется, может быть Fc-рецептор или C1 компонент комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260, Winter et al.

Реактивность 191P4D12 антител к 191P4D12-родственному белку может быть установлена несколькими хорошо известными способами, включая Вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, ELISA и FACS-анализ, с использованием при необходимости 191P4D12-родственных белков, 191P4D12-экспрессирующих клеток или их экстрактов. 191P4D12 антитело или его фрагмент может быть помечено обнаружимым маркером или конъюгировано со второй молекулой. Подходящие обнаружимые маркеры включают, но не ограничиваются этим, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, биолюминесцентное соединение, хемилюминесцентное соединение, металлохелат или фермент. Кроме того, биспецифические антитела, специфичные к двум или более 191P4D12 эпитопам, создаются с использованием способов, общеизвестных в данной области техники. Гомодимерные антитела также могут быть созданы при помощи методов перекрестного сшивания, известных в данной области техники (например, Wolff et al., *Cancer Res.* 53: 2560-2565).

В следующем предпочтительном варианте осуществления 191P4D12 MAb изобретения представляет собой антитело, содержащее тяжелую и легкую цепи антитела, обозначенного Ha22-2(2,4)6.1. Тяжелая цепь Ha22-2(2,4)6.1 состоит из аминокислотной последовательности в пределах от 20-го E остатка до 466-го K остатка последовательности SEQ ID NO: 7, и легкая цепь Ha22-2(2,4)6.1 состоит из аминокислотной последовательности в пределах от 23-го D остатка до 236-го C остатка последовательности SEQ ID NO: 8, последовательность которых представлена на фиг. 2 и 3. В предпочтительном варианте осуществления Ha22-2(2,4)6.1 конъюгировано с цитотоксическим средством.

Гибридома, продуцирующая антитело, обозначенное Ha22-2(2,4)6.1, была направлена (через Федерал-экспресс) в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 18 августа 2010, и получила инвентарный номер РТА-11267.

III) Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

В другом аспекте изобретение предоставляет конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADCs), содержащие антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующее рост средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконоъюгат). В другом аспекте изобретение дополнительно предоставляет способы использования ADCs. В одном аспекте ADC содержит какие-либо из указанных в описании 191P4D12 MAbs, ковалентно присоединенные к цитотоксическому средству или подающемуся обнаружению средству.

Использование конъюгатов антитела с лекарственным средством для локализованной доставки цитотоксических или цитостатических средств, т.е. лекарственных средств для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток при лечении рака (Syrgios and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; патент США № 4975278), предоставляет возможность целенаправленной доставки молекул лекарственного средства в опухоли и внутриклеточного накопления в них, когда системное введение этих неконъюгированных лекарственных средств может приводить к неприемлемым уровням токсичности по отношению к нормальным клеткам, таким же как и для опухолевых клеток, которые должны быть уничтожены (Baldwin et al. (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Таким образом, проводится поиск максимальной эффективности в сочетании с минимальной токсичностью. Как сообщалось, и поликлональные антитела и моноклональные антитела используются в этих стратегиях (Rowland et al. (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Лекарственные средства, используемые в этих методах, включают дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндезин (Rowland et al. (1986) *supra*). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) и калихимидин (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Токсины могут оказывать свое цитотоксическое и цитостатическое действие с помощью некоторых механизмов, включая связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некото-

рые цитотоксические лекарственные средства обычно бывают неактивными или менее активными при конъюгировании с крупными антителами или белковыми лигандами рецепторов.

Примером конъюгатов антитело-лекарственное средство являются ZEVALIN® (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idec), представляющий собой конъюгат антитела с радиоизотопом, состоящий из мышиного IgG1 каппа моноклонального антитела к CD20 антигену, обнаруженному на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов, и ¹¹¹In или ⁹⁰Y радиоизотопа, связанных при помощи линкера-хелатора тиомочевины (Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69).

Дополнительно MYLOTARG™ (гемтузумаб озогамин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из человеческого huCD33 антитела, связанного с калихимицином, был одобрен в 2000 для лечения острой миелоидной лейкемии с помощью инъекций (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патенты США №4970198; 5 079233; 5 585 089; 5 606040; 5 693 762; 5 739 116; 5 767285; 5 773 001).

Дополнительно кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из huC242 антитела, связанного через дисульфидный линкер SPP с молекулой майтанзиноидного лекарственного средства, DM1, находится на II стадии испытаний в отношении применения для лечения видов рака, экспрессирующих CanAg, таких как колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка и другие.

Дополнительно MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антипротаст специфического мембранного антигена (PSMA) моноклонального антитела, связанного с молекулой майтанзиноидного лекарственного средства, DM1, находится в состоянии разработки для возможного лечения опухолей предстательной железы.

Наконец, ауристатиновые пептиды, ауристатин E (AE) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетический аналог доластатина, были конъюгированы с химерными моноклональными антителами сBR96 (специфичными к Lewis Y при карциномах) и сAC10 (специфичными к CD30 при гемобластозах) (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) и находятся в процессе терапевтической разработки.

Далее в настоящем документе описаны химиотерапевтические средства, пригодные для получения ADCs. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaire officinalis*, гелонин, митогелин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 года. Для получения радиокоъюгированных антител доступно множество радионуклидов. Примеры включают ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re. Конъюгаты антитела с цитотоксическим средством получают с использованием различных бифункциональных связывающих белки средств, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителил)пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин можно получать, как описано в Vitetta et al. (1987) Science, 238:1098. Типичным примером хелатирующего средства для конъюгации радионуклида с антителом является меченная по углероду-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) (WO 94/11026).

Также в настоящем документе рассматриваются конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихимицин, майтанзиноиды, доластатин, ауристатин, трихотецен и CC1065 и производные этих токсинов, которые обладают токсической активностью.

III A) Майтанзиноиды.

Майтанзиноидные соединения, пригодные для использования в качестве молекул майтанзиноидных лекарственных средств, хорошо известны в данной области техники, и их можно выделить из природных источников известными способами, получить с помощью методов генетической инженерии (смотри Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973), или майтанзинол и аналоги майтанзинола можно получить синтетическим путем, используя известные методы.

Типичные молекулы майтанзиноидных лекарственных средств включают молекулы с модифицированным ароматическим кольцом, такое как: C-19-дехлоро (патент США 4256746) (полученным посредством восстановления ансамитоцина P2 гидридом алюминия лития); C-20-гидрокси (или C-20-деметил) +/- C-19-дехлоро (патенты США № 4361650 и 4307016) (полученным деметилизацией с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с применением LAH); и C-20-деметокси, C-20-ацилокси (-OCOR), +/- дехлоро (патент США № 4294757) (полученного посредством ацилирования с

применением ацилхлоридов) и молекулы с модификациями в других положениях.

Типичные молекулы майтанзиноидных лекарственных средств также включают молекулы с такими модификациями как С-9-SH (патент США 4424219) (полученная посредством реакции майтанзинола с H_2S или P_2S_5); С-14-алкоксиметил(деметокси/ CH_2OR) (патент США 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH_2OH или CH_2OAc) (патент США 4450254) (полученные из *Nocardia*); С-15-гидрокси/ацилокси (патент США 4364 866) (полученная посредством конверсии майтанзинола *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США № 4313946 и 4315929) (выделенная из *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенты США № 4362663 и 4322348) (полученная деметилированием майтанзинола *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (патент США 4371533) (полученная посредством восстановления майтанзинола трихлоридом титана/LAH).

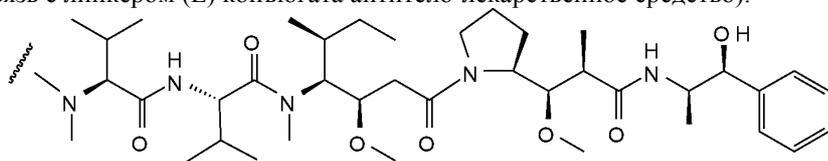
ADCs, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение описаны, например, в патентах США № 5208020; 5416064; 6441163 и Европейском патенте EP 0425235 B1, описания которых в полном объеме включены в настоящий документ путем отсылки. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) описывает ADCs, содержащие майтанзиноид, обозначенный DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против колоректального рака человека. Обнаружено, что конъюгат был высокотоксичен для культивируемых клеток рака толстого кишечника, и показана противоопухолевая активность при анализе роста опухоли *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) описывает ADCs, в которых майтанзиноид через дисульфидный линкер конъюгирован с мышиным антителом A7, связывающиеся с антигеном клеточных линий рака толстого кишечника человека, или с другим моноклональным антителом мыши TA.1, которое связывается с онкогеном HER-2/neu. Цитотоксичность конъюгата TA.1-майтанзиноид тестировали *in vitro* на клеточной линии рака молочной железы человека SK-BR-3, экспрессирующей 3×10^5 поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Лекарственный конъюгат достигал степени цитотоксичности, сходной со степенью цитотоксичности свободного майтанзиноидного лекарственного средства, которую можно увеличить, увеличивая количество майтанзиноидных молекул на молекулу антитела. Конъюгат A7-майтанзиноид продемонстрировал низкую системную цитотоксичность у мышей.

III B) Ауристатины и долостатины.

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело изобретения, конъюгированное с долостатинами или пептидными аналогами и производными долостатинов, ауристатины (патенты США № 5635483; 5780588). Показано, что долостатины и ауристатины препятствуют активности микротрубочек, гидролизу ГТФ и делению ядра и клетки (Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12):3580-3584) и обладают противоопухолевой (патент США 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Молекулу лекарственного средства долостатина или ауристатины можно связывать с антителом через N-конец (амино) или C-конец (карбоксильный) пептидной группы лекарственного средства (WO 02/088172).

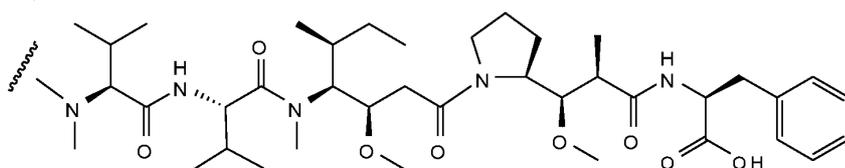
Типичные примеры ауристатины включают присоединенные по N-концу группы лекарственного средства монометилауристатины DE и DF, описанные в Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, представленной 28 марта 2004 года и описанной в патентной публикации США № 2005/0238649, раскрытие которой полностью включается в описание путем отсылки.

Типичный пример ауристатины представляет собой MMAE (где волнистая линия показывает ковалентную связь с линкером (L) конъюгата антитело-лекарственное средство).



MMAE

Другой типичный пример ауристатины представляет собой MMAF, где волнистая линия указывает ковалентную связь с линкером (L) конъюгата антитело-лекарственное средство (патент США 2005/0238649).



MMAF

Дополнительные типичные примеры, содержащие MMAE или MMAF, и различные линкерные компоненты (описанные далее в настоящем документе) имеют следующие структуры и сокращения (где Ab означает антитело, S означает серу антитела, а p представляет собой число от 1 приблизительно до 8):

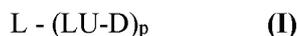
зовании конъюгата для детекции он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например ^{99m}Tc или ^{123}I , или спиновую метку для получения изображения ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивные или другие метки можно вводить в конъюгат известными способами. Например, пептид можно биосинтезировать или синтезировать посредством химического синтеза аминокислот с применением подходящих предшественников аминокислот, содержащих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как ^{99m}Tc или ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re и ^{111}In , можно присоединить через цистеиновый остаток в пептиде. Иттрий-90 можно присоединять посредством лизинового остатка. Для введения йода-123 можно использовать способ IODOGEN (Fraker et al. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57). В "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описаны другие способы.

IV) Конъюгаты антитело-лекарственное средство, связывающие 191P4D12.

Настоящее изобретение предоставляет в числе прочего конъюгаты антитело-лекарственное средство, предназначенные для направленной доставки лекарственных средств. Изобретатели обнаружили, что конъюгаты антитело-лекарственное средство обладают сильной цитотоксической и/или цитостатической активностью в отношении клеток, экспрессирующих 191P4D12. Конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антитело, ковалентно связанное по меньшей мере с одной молекулой лекарственного средства. Молекулы лекарственного средства могут быть ковалентно связаны непосредственно или через линкерный фрагмент (LU).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват, где

L представляет собой молекулу антитела, например 191P4D12 MAb настоящего изобретения, и

(LU-D) является "блоком" линкерный фрагмент-молекула лекарственного средства, где:

LU- представляет собой линкерный фрагмент; и

-D представляет собой молекулу лекарственного средства, обладающего цитостатической или цитотоксической активностью против клетки-мишени; и

p является целым числом от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления p находится в пределах от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления p находится в пределах от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления p является 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват, где

L представляет собой молекулу антитела, например 191P4D12 MAb; и

-A_a-W_w-Y_y- представляет собой линкерный фрагмент (LU), в котором

-A- представляет собой фрагмент для расширения ("расширитель"),

а является 0 или 1,

каждый -W- независимо является аминокислотным фрагментом,

w является целым числом в пределах от 0 до 12,

-Y- представляет собой самоуничтожающийся спейсерный фрагмент,

y является 0, 1 или 2;

-D представляет собой молекулу лекарственного средства, обладающего цитостатической или цитотоксической активностью против клетки-мишени; и

p является целым числом от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления a является 0 или 1, w является 0 или 1, и y является 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a является 0 или 1, w является 0 или 1, и y является 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления p находится в пределах от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления p находится в пределах от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления p представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления p является 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления, когда w не является нулем, y является 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, когда w является 1-12, y является 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления w является 2-12 и y является 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a является 1, а w и y являются 0.

Для композиций, содержащих множество антител, нагрузка лекарственного средства представлена в виде p, среднего числа молекул лекарственного средства на антитело. Нагрузка лекарственного средства может находиться в пределах от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на антитело. Среднее

число молекул лекарственного средства на антитело в препарате после реакции конъюгации может быть охарактеризовано с помощью обычных методов, таких как масс-спектрометрия, анализ ELISA и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение конъюгатов антитело-лекарственное средство в виде p . В некоторых случаях разделение, очистку и характеристику гомогенных конъюгатов антитело-лекарственное средство, где p представляет собой определенное значение конъюгатов антитело-лекарственное средство с другими нагрузками лекарственным средством, можно оценить такими способами, как ВЭЖХ с обратной фазой или электрофорез. В иллюстративных вариантах осуществления p находится в пределах от 2 до 8.

Получение конъюгированных соединений антитело-лекарственное средство может осуществляться с помощью любого метода, известного специалисту в данной области. Коротко, конъюгированные соединения антитело-лекарственное средство содержат 191P4D12 MAb в качестве молекулы антитела, лекарственное средство и необязательно линкер, соединяющий лекарственное средство и связующий агент. В предпочтительных вариантах осуществления антитело представляет собой 191P4D12 MAb, содержащее вариabельные области тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного Ha22-2(2,4)6.1 и описанного выше. В более предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой 191P4D12 MAb, содержащее тяжелую и легкую цепь антитела, обозначенного Ha22-2(2,4)6.1 и описанного выше. Для ковалентного связывания лекарственных средств и/или линкеров со связующими агентами имеется в распоряжении целый ряд различных реакций. Это часто достигается посредством реагирования остатков аминокислот связующего агента, например молекулы антитела, включая аминокислоты лизина, свободные карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы цистеина и различные фрагменты ароматических аминокислот. Одним из обычно используемых неспецифических методов ковалентного связывания является карбодимидная реакция для связи карбокси (или амино) групп соединения с амино (или карбокси) группами антитела. Кроме того, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или имидоэферы, используются для того, чтобы связать аминокислотную группу соединения с аминокислотными группами молекулы антитела. Кроме того, для прикрепления лекарственных средств к связующим агентам доступной является реакция с шиффовыми основаниями. Этот метод затрагивает окисление периодатом лекарственного средства, содержащего гликоль или гидроксигруппы, таким образом, образуя альдегид, который затем вступает в реакцию со связующим агентом. Присоединение происходит через образование шиффового основания с аминокислотными группами связующего агента. Изотиоцианаты также могут использоваться в качестве сопрягающих агентов для ковалентного связывания лекарственных средств со связующими агентами. Специалистам в данной области известны другие методы, входящие в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления при подходящих условиях в реакцию с лекарственным средством вступает промежуточный продукт, являющийся предшественником линкера. В некоторых вариантах осуществления используются реакционно-способные группы на лекарственном средстве и/или промежуточном продукте. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным продуктом, или полученное лекарственное средство, потом вступает в реакцию с 191P4D12 MAb при соответствующих условиях.

Каждое из конъюгированных соединений антитело-лекарственное средство описано в этом документе более подробно. Кроме того, синтез и структура типичных линкерных фрагментов, "расширителей", аминокислотных фрагментов, самоуничтожающихся линкерных фрагментов, и молекулы лекарственных средств описаны в опубликованных патентных заявках США № 2003-0083263, 2005-0238649 и 2005-0009751, каждая из которых полностью и во всех смыслах включена в описание путем отсылки.

V) Линкерные фрагменты.

Как правило, конъюгированные соединения антитело-лекарственное средство содержат линкерный фрагмент между молекулой лекарственного средства и антителом. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется при внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера освобождает молекулу лекарственного средства от антитела во внутриклеточную окружающую среду. В других вариантах осуществления линкер не расщепляется, а лекарственное средство освобождается, например, при разрушении антитела.

В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется с помощью расщепляющего агента, присутствующего во внутриклеточной окружающей среде (например, в лизосоме или эндосоме или ямке). Линкер может быть, например, пептидным линкером, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая, но не ограничиваясь этим, лизосомальную или эндосомальную протеазу. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин, которые, как известно, гидролизуют дипептидные производные лекарственных средств, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутри клеток-мишеней (смотри, например, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Самыми типичными являются пептидные линкеры, которые расщепляются ферментами, присутствующими в 191P4D12-экспрессирующих клетках. Например, можно использовать пептидный линкер, расщепляемый тиол-зависимой протеазой катепсином-В, который высоко экспрессируется в злокачественной ткани (напри-

мер, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 9)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в патенте США №. 6214345, полностью и во всех отношениях включенном в описание путем отсылки. В специальном варианте осуществления пептидным линкером, расщепляемым внутриклеточной протеазой, является линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, патент США №. 6214345, который описывает синтез доксорубицина с использованием линкера Val-Cit). Одно преимущество использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического средства заключается в том, что средство, как правило, в конъюгированном состоянии является ослабленным, а устойчивость конъюгатов в сыворотке в основном высокая.

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер является чувствительным к pH, т.е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. В большинстве случаев pH-чувствительный линкер гидролизуется при кислых условиях. Например, можно использовать кислото-лабильный линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, циклоаконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь или тому подобное) (см., например, патент США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik и Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Подобные линкеры являются относительно устойчивыми при нейтральных значениях pH, например значениях в крови, но являются нестабильными при более низких значениях pH 5,5 или 5,0, приблизительное значение pH в лизосомах. В определенных вариантах осуществления линкер, подвергающийся гидролизу, является тиоэфирным линкером (таким как, например, тиоэфир, присоединенный к терапевтическому агенту через ацилгидразоновую связь (см., например, патент США № 5622929).

В других вариантах осуществления линкер расщепляется при восстановительных условиях (например, дисульфидный линкер). В этой области техники известен целый ряд дисульфидных линкеров, включая, например, такие, которые могут образовываться при использовании SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDП (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксакарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол), SPDB и SMPT. (см., например, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagerу и Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. See also U.S. Patent No. 4,880, 935.)

В других определенных вариантах осуществления линкер является малонатным линкером (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), малеимидобензоильным линкером (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304) или 3'-N-амидным аналогом (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

В следующих вариантах осуществления линкерный фрагмент является нерасщепляемым, а лекарственное средство освобождается при разрушении антитела. (См. публикацию США № 2005/0238649, полностью и во всех отношениях включенную в описание путем отсылки).

Как правило, линкер является практически нечувствительным к внеклеточной окружающей среде. При использовании в описании "практически нечувствительный к внеклеточной окружающей среде" в контексте, связанном с линкером, означает, что не более около 20%, как правило, не более чем около 15%, более типично не более чем около 10%, и даже еще более типично не более чем около 5%, не более чем около 3% или не более чем около 1% линкеров в образце конъюгированного соединения антитело-лекарственное средство расщепляется, когда конъюгированное соединение антитело-лекарственное средство находится во внеклеточной окружающей среде (например, в плазме). Чувствительность линкера к внеклеточной окружающей среде можно определить, например, путем инкубирования с плазмой конъюгированного соединения антитело-лекарственное средство в течение predetermined периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 ч), а затем определения количества свободного лекарственного средства, присутствующего в плазме.

В других, не взаимоисключающих вариантах осуществления линкер оказывает содействие клеточной интернализации. В определенных вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации, когда он конъюгирован с терапевтическим агентом (т.е. в микросреде молекулы линкер-терапевтический агент конъюгированного соединения антитело-лекарственное средство, как описано в этом документе). В других вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации, когда он конъюгирован и с ауристатином соединением и I91P4D12 MAб.

Целый ряд типичных линкеров, которые могут использоваться с настоящими композициями и способами, описан в WO 2004-010957, публикации США № 2006/0074008, публикации США № 20050238649 и публикации США № 2006/0024317 (каждая из которых полностью и во всех отношениях включена в описание путем отсылки).

"Линкерный фрагмент" (LU) является бифункциональным соединением, которое можно использовать для того, чтобы соединить молекулу лекарственного средства и молекулу антитела и получить конъюгированное соединение антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент имеет формулу



где -A- представляет собой "расширитель",

а является 0 или 1,

каждый -W- независимо является молекулой аминокислоты,

w является целым числом в пределах от 0 до 12,

-Y- представляет собой самоуничтожающийся спейсерный фрагмент и

y является 0, 1 или 2.

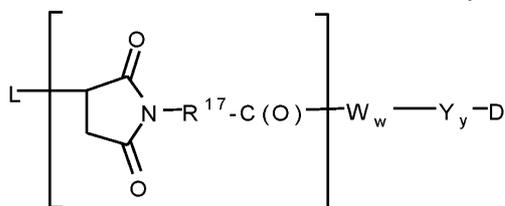
В некоторых вариантах осуществления a является 0 или 1, w является 0 или 1 и y является 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a является 0 или 1, w является 0 или 1, а y является 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления, когда w составляет от 1 до 12, y является 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления w составляет от 2 до 12, а y является 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a является 1, а w и y являются 0.

VI) Фрагмент для расширения ("расширитель").

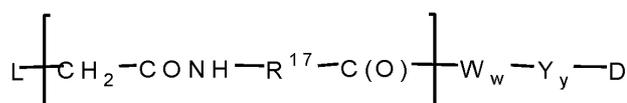
"Расширитель" (A), когда имеется, способен соединить молекулу антитела с аминокислотным фрагментом (-W-), если он имеется, со спейсерным фрагментом (-Y-), если он имеется; или с молекулой лекарственного средства (-D). Подходящие функциональные группы, которые могут присутствовать на 191P4D12 MAб (например, Na22-2(2,4)6.1), или по своей природе или в результате химической манипуляции, включают, но не ограничиваются этим, сульфгидрильную группу, аминогруппу, гидроксильную группу, аномерную гидроксильную группу углевода и карбоксил. Подходящими функциональными группами являются сульфгидрильные группы или аминогруппы. В одном примере сульфгидрильные группы могут быть получены путем восстановления внутримолекулярных дисульфидных связей антитела 191P4D12 MAб. В другом варианте осуществления сульфгидрильные группы могут быть получены при взаимодействии аминогруппы лизина антитела 191P4D12 MAб с 2-иминотиолоном (реагент Трота) или другими реагентами, порождающими сульфгидрильные группы. В определенных вариантах осуществления 191P4D12 MAб является рекомбинантным антителом и конструируется так, чтобы нести один или более лизинов. В других вариантах осуществления рекомбинантное 191P4D12 MAб конструируется так, чтобы нести дополнительные сульфгидрильные группы, например дополнительные цистеины.

В одном варианте осуществления "расширитель" образует связь с атомом серы молекулы антитела. Атом серы может происходить из сульфгидрильной группы антитела. Типичные "расширители" этого варианта осуществления изображены в квадратных скобках формул IIIa и IIIb, где L-, -W-, -Y-, -D, w и y являются, как определено выше, а R¹⁷ выбирают из -C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкенилен-, -C₁-C₁₀ алкинилен-, карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкилен)-, O-(C₁-C₈ алкенилен)-, -O-(C₁-C₈ алкинилен)-, -арилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-, -C₂-C₁₀ алкенилен-арилен-, -C₂-C₁₀ алкинилен-арилен-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-, -арилен-C₂-C₁₀ алкенилен-, -арилен-C₂-C₁₀ алкинилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-(карбоцикло)-, -C₂-C₁₀ алкенилен-(карбоцикло)-, -C₂-C₁₀ алкинилен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -(карбоцикло)-C₂-C₁₀ алкенилен-, -(карбоцикло)-C₂-C₁₀ алкинилен-, гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкилен-(гетероцикло)-, -C₂-C₁₀ алкенилен-(гетероцикло)-, -C₂-C₁₀ алкинилен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -(гетероцикло)-C₂-C₁₀ алкенилен-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкинилен-, -(CH₂CH₂O)_r- или -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, а g является целым числом в пределах от 1 до 10, где указанный алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл, карбоцикло, гетероцикло и арилен радикалы, или отдельно или как часть другой группы, обязательно являются замещенными. В некоторых вариантах осуществления указанный алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл, карбоцикло, гетероцикло и арилен радикалы, или отдельно или как часть другой группы, являются незамещенными. В некоторых вариантах осуществления R¹⁷ выбирают из -C₁-C₁₀ алкилен-, -карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкилен)-, -арилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-арилен-, -арилен-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₁-C₁₀ алкилен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -C₃-C₈ гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкилен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкилен-, -(CH₂CH₂O)_r- и -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; и g является целым числом в пределах от 1 до 10, где указанные алкиленовые группы являются незамещенными, а оставшиеся группы обязательно являются замещенными.

Из всех иллюстративных вариантов осуществления понятно, что даже в том случае, когда не указано точно, с антителом может быть связано от 1 до 20 молекул лекарственного средства (p=1-20).

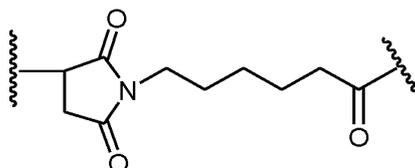


IIIa

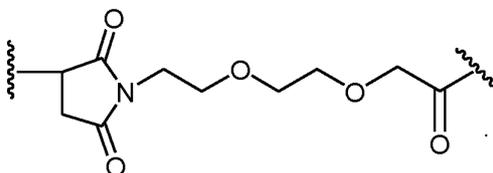


IIIb

Один типичный "расширитель" соответствует формуле IIIa, в которой R¹⁷ представляет собой -(CH₂)₅-:

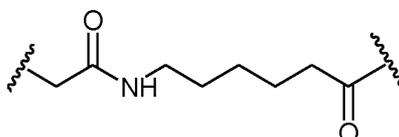


Другой типичный "расширитель" соответствует формуле IIIa, в которой R¹⁷ представляет собой -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; а r является 2:

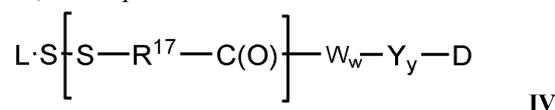


Некоторый типичный "расширитель" соответствует формуле IIIa, в которой R¹⁷ представляет собой арилен- или арилен-C₁-C₁₀ алкилен-. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой незамещенную фенильную группу.

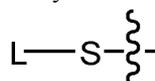
Еще один типичный "расширитель" соответствует формуле IIIb, в которой R¹⁷ представляет собой -(CH₂)₅-:



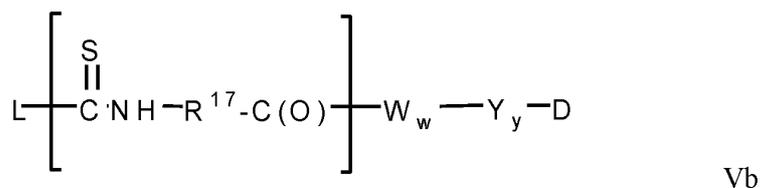
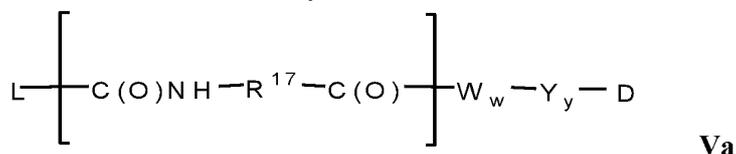
В некоторых вариантах осуществления "расширитель" связывается с молекулой антитела через дисульфидную связь между атомом серы молекулы антитела и атомом серы "расширителя". Типичный "расширитель" этого варианта осуществления показан в квадратных скобках формулы IV, в которой R¹⁷, L-, -W-, -Y-, -D, w и y являются, как определено выше.



Следует отметить, что на всем протяжении данной заявки компонент S в формуле ниже относится к атому серы молекулы антитела, если контекст не указывает иначе.

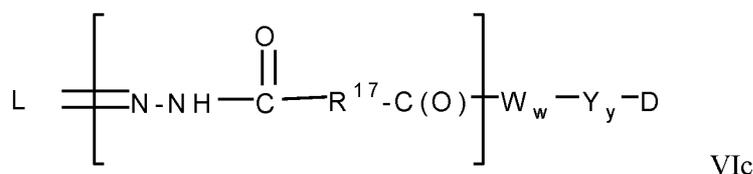
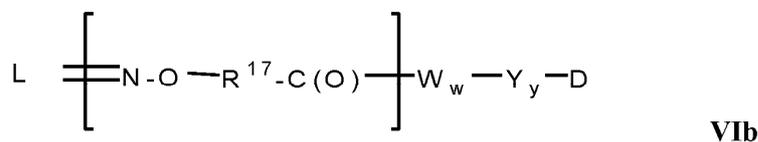
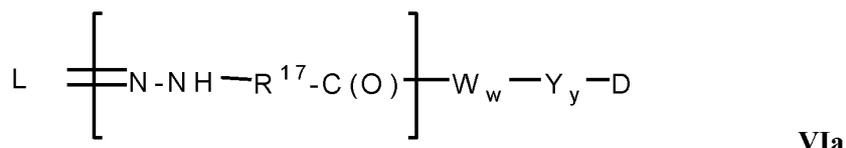


В других вариантах осуществления "расширитель" содержит реакционноспособный центр, который может образовывать связь с первичной или вторичной аминогруппой антитела. Примеры этих реакционноспособных центров включают, но не ограничиваются этим, активированные сложные эфиры, такие как сложные эфиры сукцинимиды, 4 нитрофениловые сложные эфиры, пентафторфениловые сложные эфиры, тетрафторфениловые сложные эфиры, ангидриды, хлорангидриды, сульфонилхлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Типичные "расширители" этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул Va и Vb, где -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w и y являются, как описано выше.



В некоторых вариантах осуществления "расширитель" содержит реакционноспособный центр, который является реакционноспособным по отношению к модифицированной группе углевода (-CHO), которая может присутствовать на антителе. Например, углевод может быть слабо окислен при помощи реактива, такого как йоднокислый натрий, а полученный (-CHO) фрагмент окисленного углевода может быть соединен с "расширителем", который содержит функциональность, такую как гидразид, оксим, первичный или вторичный амин, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразид, та-

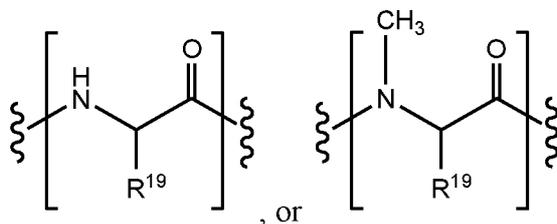
кие как описанные Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41. Типичные "расширители" этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул VIa, VIb и VIc, где $-R^{17}$ -, L-, -W-, -Y-, -D, w и y являются, как описано выше.



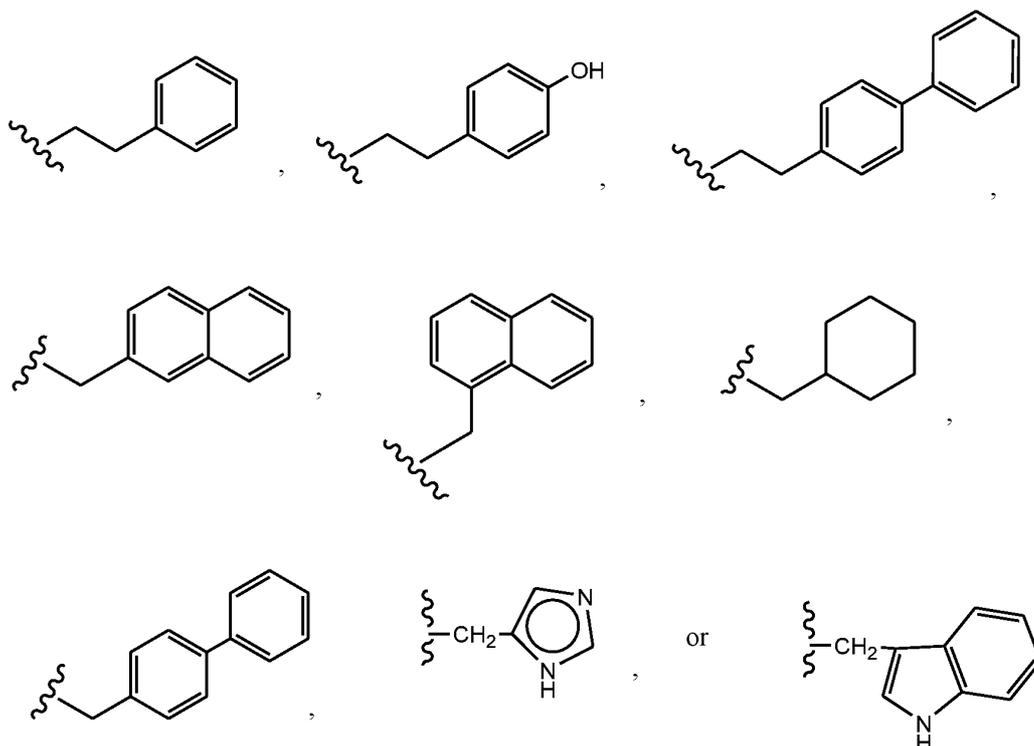
VII) Аминокислотный фрагмент.

Аминокислотный фрагмент (-W-), если присутствует, связывает "расширитель" со спейсерным фрагментом, если спейсерный фрагмент присутствует, связывает "расширитель" с молекулой лекарственного средства, если спейсерный фрагмент отсутствует, и связывает антитело с лекарственным средством, если "расширитель" и спейсерный фрагмент отсутствуют.

W_w может быть, например, монопептидом, дипептидом, трипептидом, тетрапептидом, пентапептидом, гексапептидом, гептапептидом, октапептидом, нонапептидом, декапептидом, ундекапептидом или додекапептидом. Каждый -W-компонент независимо имеет формулу, указанную ниже в квадратных скобках, а w является целым числом от 0 до 12:

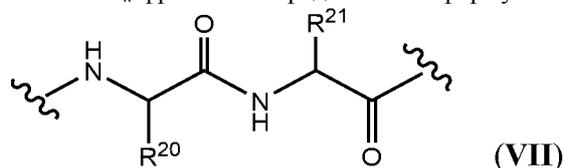


где R^{19} представляет собой водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, p-гидроксибензил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC(=NH)NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC(=NH)NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенил, циклогексил,

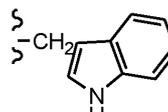


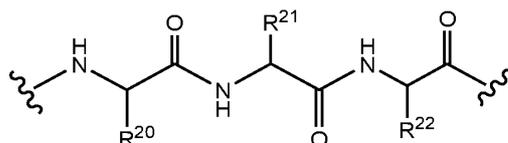
В некоторых вариантах осуществления аминокислотный фрагмент может отщепляться под воздействием одного или более ферментов, включая протеазы, ассоциированные с раком или опухолью, чтобы освободить молекулу лекарственного средства (-D), которая в одном варианте осуществления протонируется *in vivo* после высвобождения с получением лекарственного средства (D).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный фрагмент может содержать природные аминокислоты. В других вариантах осуществления аминокислотный фрагмент может содержать искусственные аминокислоты. Типичные W_w фрагменты представлены формулами (VII)-(IX):



где R^{20} и R^{21} представляют собой, как указано ниже:

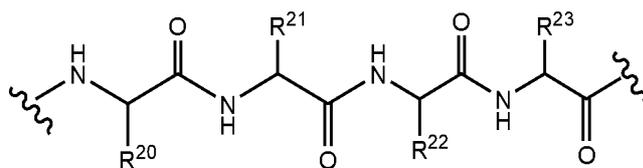
R^{20}	R^{21}
Бензил	$(CH_2)_4NH_2$;
Метил	$(CH_2)_4NH_2$;
изопропил	$(CH_2)_4NH_2$;
изопропил	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
Бензил	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
Изобутил	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
<i>втор</i> -бутил	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
Бензил	метил;
Бензил	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;



(VIII)

где R^{20} , R^{21} и R^{22} представляют собой, как указано ниже:

R^{20}	R^{21}	R^{22}
Бензил	бензил	$(CH_2)_4NH_2$;
изопропил	бензил	$(CH_2)_4NH_2$; и
H	бензил	$(CH_2)_4NH_2$;



(IX)

где R^{20} , R^{21} , R^{22} и R^{23} представляют собой, как указано ниже:

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	бензил	изобутил	H; и
Метил	изобутил	метил	изобутил.

Типичные аминокислотные фрагменты включают, но не ограничиваются этим, фрагменты формулы VII, где

R^{20} представляет собой бензил, а R^{21} представляет собой $-(CH_2)_4NH_2$;

R^{20} является изопропилом, а R^{21} представляет собой $-(CH_2)_4NH_2$; или

R^{20} является изопропилом, и R^{21} представляет собой $-(CH_2)_3NHCONH_2$.

Другим примером аминокислотного компонента является фрагмент формулы VIII, где R^{20} представляет собой бензил, R^{21} представляет собой бензил и R^{22} представляет собой $-(CH_2)_4NH_2$.

Можно создать подходящие фрагменты $-W_w-$ и оптимизировать их по селективности в отношении ферментативного расщепления определенным ферментом, например опухоль-ассоциированной протеазой. В одном варианте осуществления фрагмент $-W_w-$ является частью, расщепление которой катализируется катепсином В, С и D, или протеолитическим ферментом плазмином.

В одном варианте осуществления $-W_w-$ представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Когда R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} или R^{23} является иным, чем водород, атом углерода, к которому присоединяется R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} или R^{23} , является хиральным.

Каждый атом углерода, к которому присоединяется R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} или R^{23} , независимо находится в (S) или (R) конфигурации.

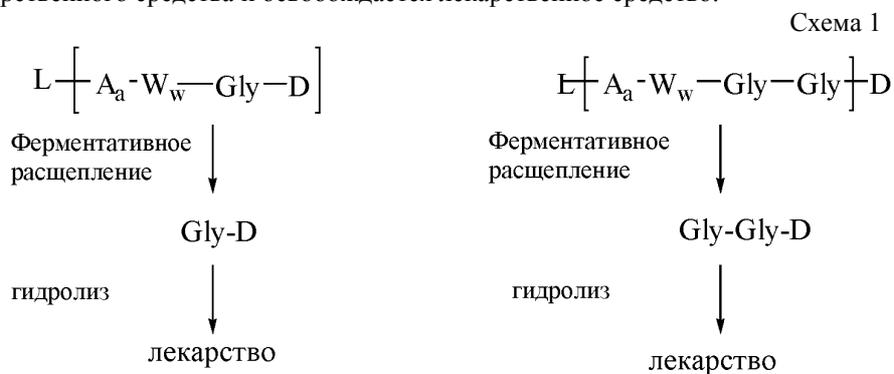
В одном аспекте аминокислотный фрагмент представляет собой валин-цитруллин (vc или Val-Cit). В другом аспекте аминокислотный фрагмент представляет собой фенилаланин-лизин (т.е. fk). В следующем аспекте аминокислотный фрагмент представляет собой N-метилвалин-цитруллин. В еще одном аспекте аминокислотный фрагмент представляет собой 5-аминовалериановую кислоту, гомофенилаланин лизин, тетраизохинолинкарбоксилат лизин, циклогексилаланин лизин, изонипекатиновая кислота лизин, бета-аланин лизин, глицин серин валин глутамин и изонипекатиновая кислота.

VIII) Спейсерный фрагмент.

Спейсерный фрагмент (-Y-), если присутствует, связывает аминокислотный фрагмент с молекулой лекарственного средства, когда аминокислотный фрагмент присутствует. Альтернативно спейсерный фрагмент связывает "расширитель" с молекулой лекарственного средства, когда аминокислотный фрагмент отсутствует. Спейсерный фрагмент также связывает молекулу лекарственного средства с молекулой антитела, когда отсутствуют и аминокислотный фрагмент и "расширитель".

Спейсерные фрагменты бывают двух основных типов: несамоуничтожающиеся или самоуничтожающиеся. Несамоуничтожающийся спейсер - это спейсер, в котором часть или весь спейсерный фрагмент остается связанным с молекулой лекарственного средства после отщепления, в частности ферментативного, аминокислотного фрагмента от конъюгата антитело-лекарственное средство. Примеры несамоуничтожающегося спейсерного фрагмента включают, но не ограничиваются этим, (глицин-глицин) спейсерный фрагмент и глициновый спейсерный фрагмент (оба показаны на схеме 1) (ниже). Когда конъюгат, содержащий спейсерный фрагмент глицин-глицин или глициновый спейсерный фрагмент,

претерпевает ферментативное расщепление при посредстве фермента (например, протеазы, ассоциированной с опухолевой клеткой, протеазы, ассоциированной со злокачественной опухолевой клеткой, или протеазы, ассоциированной с лимфоцитом), фрагмент "глицин-глицин-лекарственное средство" или фрагмент "глицин-лекарственное средство" отщепляется от L-A_a-W_w-. В одном варианте осуществления в клетке-мишени протекает независимая реакция гидролиза, при этом расщепляется связь глицин-молекула лекарственного средства и освобождается лекарственное средство.



В некоторых вариантах осуществления несамоуничтожающийся спейсер (-Y-) представляет собой -Gly-. В некоторых вариантах осуществления несамоуничтожающийся спейсер (-Y-) представляет собой -Gly-Gly-.

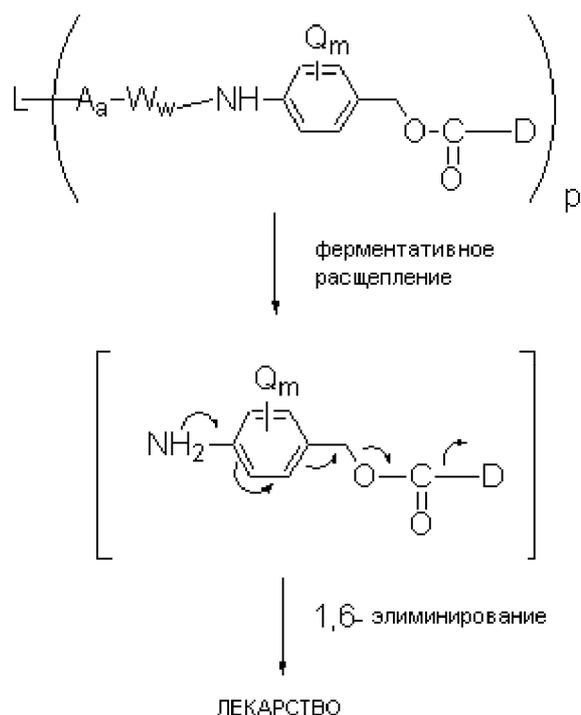
В одном варианте осуществления представляется конъюгат лекарственное средство-линкер, в котором спейсерный фрагмент отсутствует (-Y_y-, где y=0), или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват.

Альтернативно конъюгат, содержащий самоуничтожающийся спейсерный фрагмент, может высвободить -D. При использовании в описании термин "самоуничтожающийся спейсер" относится к бифункциональному химическому фрагменту, который способен ковалентно связывать вместе две расположенные на расстоянии химические молекулы в стабильную трехсоставную молекулу. Он будет спонтанно отделяться от второго химического фрагмента, если его связь с первой молекулой расщепляется.

В некоторых вариантах осуществления -Y_y- представляет собой молекулу p-аминобензилового спирта (РАВ) (см. схемы 2 и 3), фениленовая часть которого замещается Q_m, где Q представляет собой -C₁-C₈ алкил, -C₁-C₈ алкенил, -C₁-C₈ алкинил, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₁-C₈ алкенил), -O-(C₁-C₈ алкинил), -галоген, - нитро или -циано; а m является целым числом в пределах от 0 до 4. Алкил, алкенил и алкинильные группы, или отдельно или как часть другой группы, необязательно могут быть замещенными.

В некоторых вариантах осуществления -Y- представляет собой группу РАВ, которая связывается с -W_w- через аминотом азота группы РАВ, и соединяется непосредственно с -D через карбонатную, карбаматную или простую эфирную группу. Не будучи связанной с какой-либо отдельной теорией или механизмом, схема 2 показывает возможный механизм высвобождения лекарственного средства из группы РАВ, которая присоединяется непосредственно к -D через карбаматную или карбонатную группу, как описано Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872.

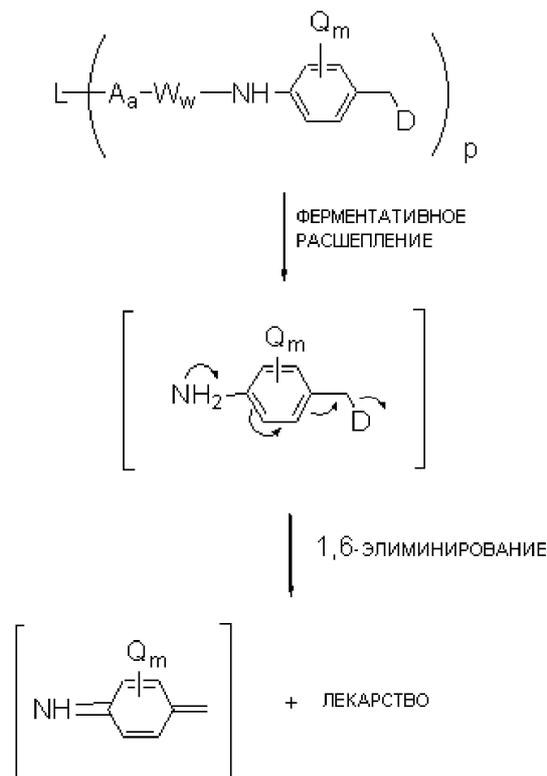
Схема 2



На схеме 2 Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-C_1-C_8$ алкенил, $-C_1-C_8$ алкинил, $-O-(C_1-C_8)$ алкил), $-O-(C_1-C_8)$ алкенил), $-O-(C_1-C_8)$ алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m является целым числом в пределах 0-4; и p находится в пределах примерно от 1 до 20. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, или отдельно или как часть другой группы, необязательно могут быть замещенными.

Не будучи связанной с какой-либо отдельной теорией или механизмом, схема 3 показывает возможный механизм высвобождения лекарства из РАВ группы, которая присоединяется непосредственно к -D через простую эфирную или аминную связь, в которой D включает группу кислорода или азота, которая является частью молекулы лекарственного средства.

Схема 3



На схеме 3 Q представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-C_1-C_8$ алкенил, $-C_1-C_8$ алкинил, $-O-(C_1-C_8)$ алкил),

-O-(C₁-C₈ алкенил), -O-(C₁-C₈ алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m является целым числом в пределах 0-4; и p находится в пределах примерно от 1 до 20. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, или отдельно, или как часть другой группы, необязательно могут быть замещенными.

Другие примеры самоуничтожающихся спейсерных фрагментов включают, но не ограничиваются этим, ароматические соединения, являющиеся электронно-сходными с PAB группой, такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто- или пара-аминобензилацетали. Могут использоваться спейсеры, подвергающиеся циклизации после гидролиза амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] системы колец (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberg et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). Удаление амин-содержащих лекарственных средств, которые являются замещенными в α-положении глицина (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447) - это также примеры самоуничтожающихся спейсеров.

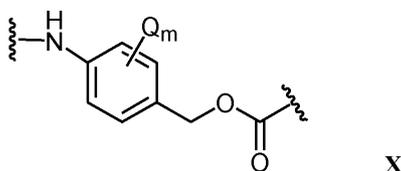
В одном варианте осуществления спейсерный фрагмент представляет собой разветвленный бис(гидроксиметил)-стирольный (BHMS) фрагмент, как показано на схеме 4, который может использоваться для включения и высвобождения лекарственных средств.



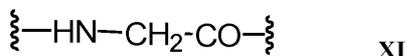
На схеме 4 Q представляет собой -C₁-C₈ алкил, -C₁-C₈ алкенил, -C₁-C₈ алкинил, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₁-C₈ алкенил), -O-(C₁-C₈ алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m является целым числом в пределах 0-4; n представляет собой 0 или 1; и p находится в пределах примерно от 1 до 20. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, или отдельно или как часть другой группы, необязательно могут быть замещенными.

В некоторых вариантах осуществления -D фрагменты являются одинаковыми. В другом варианте осуществления -D фрагменты являются разными.

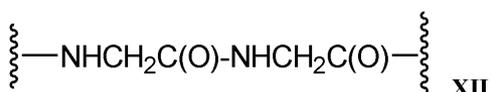
В одном аспекте спейсерные фрагменты (-Y_y-) представлены формулами (X)-(XII):



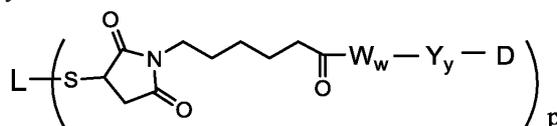
где Q представляет собой -C₁-C₈ алкил, -C₁-C₈ алкенил, -C₁-C₈ алкинил, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₁-C₈ алкенил), -O-(C₁-C₈ алкинил), -галоген, -нитро или -циано; и m является целым числом в пределах 0-4. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, или отдельно или как часть другой группы, необязательно могут быть замещенными.



и



Варианты осуществлений формулы I и II, содержащие конъюгированные соединения антитело-лекарственное средство, могут включать



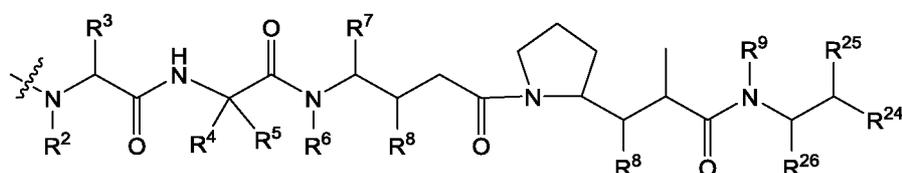
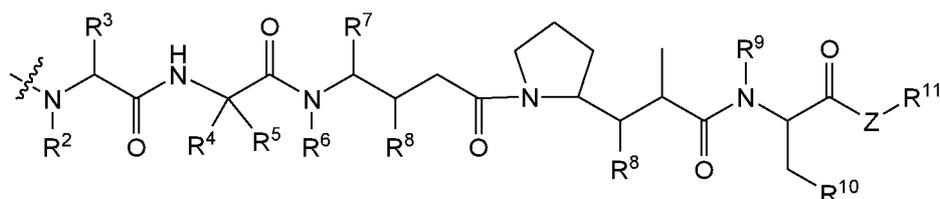
где w и y каждый представляют собой 0, 1 или 2, и

5138036; 5076973; 4986988; 4978744; 4879278; 4816444; и 4486414, каждый из которых полностью и во всех отношениях включен в описание путем отсылки.

Показано, что ауристатины вмешиваются в динамику микротрубочек и деление ядра и клетки и обладают противоопухолевой активностью. Ауристатины связывают тубулин и могут оказывать цитотоксическое или цитостатическое действие на 191P4D12-экспрессирующие клетки. Существует множество различных методов анализа, известных в данной области техники, которые можно использовать для определения, проявляет ли ауристатин или полученный конъюгат антитело-лекарственное средство цитотоксическое или цитостатическое действие на нужную линию клеток.

В данной области техники известны способы определения, связывает ли соединение тубулин. См., например, Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; и Hamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149. В целях настоящего изобретения можно определить относительную аффинность соединения к тубулину. Некоторые предпочтительные ауристатины настоящего изобретения связывают тубулин с аффинностью в пределах от 10-кратно более низкой (низкая аффинность), чем аффинность связывания ММАЕ с тубулином, до аффинности в 10 раз, 20 раз или даже 100 раз более высокой (высокая аффинность), чем аффинность связывания ММАЕ с тубулином.

В некоторых вариантах осуществления -D представляет собой ауристатин формулы D_E или D_F:

D_ED_F

или его фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму;

где независимо в каждом положении

волнистая линия показывает связь;

R² представляет собой -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил или -C₂-C₂₀ алкинил;

R³ представляет собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил, -C₂-C₂₀ алкинил, -карбоцикл, -C₁-C₂₀ алкилен (карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкенилен(карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкинилен(карбоцикл), -арил, -C₁-C₂₀ алкилен(арил), -C₂-C₂₀ алкенилен(арил), -C₂-C₂₀ алкинилен(арил), гетероцикл, -C₁-C₂₀ алкилен(гетероцикл), -C₂-C₂₀ алкенилен(гетероцикл) или -C₂-C₂₀ алкинилен(гетероцикл);

R⁴ представляет собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил, -C₂-C₂₀ алкинил, карбоцикл, -C₁-C₂₀ алкилен (карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкенилен(карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкинилен(карбоцикл), арил, -C₁-C₂₀ алкилен(арил), -C₂-C₂₀ алкенилен(арил), -C₂-C₂₀ алкинилен(арил), -гетероцикл, -C₁-C₂₀ алкилен(гетероцикл), -C₂-C₂₀ алкенилен(гетероцикл) или -C₂-C₂₀ алкинилен(гетероцикл);

R⁵ представляет собой -H или -C₁-C₈ алкил;

или R⁴ и R⁵ вместе образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу -(CR^aR^b)_s-, где R^a и R^b независимо представляют собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил, -C₂-C₂₀ алкинил или карбоцикл, а s представляет собой 2, 3, 4, 5 или 6;

R⁶ представляет собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил или -C₂-C₂₀ алкинил;

R⁷ представляет собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил, -C₂-C₂₀ алкинил, карбоцикл, -C₁-C₂₀ алкилен (карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкенилен(карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкинилен(карбоцикл), -арил, -C₁-C₂₀ алкилен(арил), -C₂-C₂₀ алкенилен(арил), -C₂-C₂₀ алкинилен(арил), гетероцикл, -C₁-C₂₀ алкилен(гетероцикл), -C₂-C₂₀ алкенилен(гетероцикл) или -C₂-C₂₀ алкинилен(гетероцикл);

каждый R⁸ представляет собой независимо -H, -OH, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил, -C₂-C₂₀ алкинил, -O-(C₁-C₂₀ алкил), -O-(C₂-C₂₀ алкенил), -O-(C₁-C₂₀ алкинил) или -карбоцикл;

R⁹ представляет собой -H, -C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил или -C₂-C₂₀ алкинил;

R²⁴ представляет собой -арил, -гетероцикл или -карбоцикл;

R²⁵ представляет собой -H, C₁-C₂₀ алкил, -C₂-C₂₀ алкенил, -C₂-C₂₀ алкинил, -карбоцикл, -O-(C₁-C₂₀ алкил), -O-(C₂-C₂₀ алкенил), -O-(C₂-C₂₀ алкинил) или OR¹⁸, где R¹⁸ представляет собой -H, гидроксильную

защитную группу или прямую связь, где OR^{18} представляет =O;

R^{26} представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил или $-C_2-C_{20}$ алкинил, -арил, -гетероцикл или -карбоцикл;

R^{10} представляет собой -арил или -гетероцикл;

Z представляет собой -O, -S, -NH или $-NR^{12}$, где R^{12} представляет собой $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил или $-C_2-C_{20}$ алкинил;

R^{11} представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил, $-C_2-C_{20}$ алкинил, -арил, -гетероцикл, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ или $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;

m является целым числом в пределах от 1-1000 или $m=0-1000$;

R^{13} представляет собой $-C_2-C_{20}$ алкилен, $-C_2-C_{20}$ алкенилен или $-C_2-C_{20}$ алкинилен;

R^{14} представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил или $-C_2-C_{20}$ алкинил;

в каждом случае R^{15} независимо представляет собой -H, -COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ алкил, $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ алкенил или $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ алкинил;

в каждом случае R^{16} независимо представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил, $-C_2-C_{20}$ алкинил или $-(CH_2)_n-COOH$; и

n является целым числом в пределах от 0 до 6;

где указанные алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоциклические и гетероциклические радикалы, отдельно или как часть другой группы, необязательно являются замещенными.

Ауристатины формулы D_E включают такие, в которых указанные алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоциклические и гетероциклические радикалы являются незамещенными.

Ауристатины формулы D_E включают такие, в которых группы R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 являются незамещенными, а группы R^{19} , R^{20} и R^{21} необязательно являются замещенными, как описано в этом документе.

Ауристатины формулы D_E включают такие, в которых

R^2 представляет собой C_1-C_8 алкил;

R^3 , R^4 и R^7 независимо выбирают из -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил, $-C_2-C_{20}$ алкинил, моноциклический C_3-C_6 карбоцикл, $-C_1-C_{20}$ алкилен(моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), $-C_2-C_{20}$ алкенилен(моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), $-C_2-C_{20}$ алкинилен(моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), C_6-C_{10} арил, $-C_1-C_{20}$ алкилен(C_6-C_{10} арил), $-C_2-C_{20}$ алкенилен(C_6-C_{10} арил), $-C_2-C_{20}$ алкинилен(C_6-C_{10} арил), гетероцикл, $-C_1-C_{20}$ алкилен(гетероцикл), $-C_2-C_{20}$ алкенилен(гетероцикл) или $-C_2-C_{20}$ алкинилен(гетероцикл); где указанный алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, карбоцикл, арильный и гетероциклический радикалы необязательно являются замещенными;

R^5 представляет собой -H;

R^6 представляет собой $-C_1-C_8$ алкил;

каждый R^8 независимо выбирают из -OH, -O($-C_1-C_{20}$ алкил), -O($-C_2-C_{20}$ алкенил) или -O($-C_2-C_{20}$ алкинил), где указанный алкил, алкенил и алкинил-радикалы необязательно являются замещенными;

R^9 представляет собой -H или $-C_1-C_8$ алкил;

R^{24} необязательно замещается -фенилом;

R^{25} представляет собой $-OR^{18}$;

где R^{18} представляет собой H, гидроксильную защитную группу или прямую связь, где OR^{18} представляет =O;

R^{26} выбирают из -H, $-C_1-C_{20}$ алкила, $-C_2-C_{20}$ алкенила, $-C_2-C_{20}$ алкинила или -карбоцикла;

где указанные алкил, алкенил, алкинил и карбоциклический радикалы необязательно являются замещенными;

или фармацевтически приемлемой соли или сольватной формы.

Ауристатины формулы D_E включают такие, где

R^2 представляет собой метил;

R^3 представляет собой -H, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил или C_2-C_8 алкинил, где указанные алкил, алкенил и алкинил-радикалы необязательно являются замещенными;

R^4 представляет собой -H, $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, моноциклический C_3-C_6 карбоцикл, $-C_6-C_{10}$ арил, $-C_1-C_8$ алкилен(C_6-C_{10} арил), $-C_2-C_8$ алкенилен(C_6-C_{10} арил), $-C_2-C_8$ алкинилен(C_6-C_{10} арил), $-C_1-C_8$ алкилен (моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), $-C_2-C_8$ алкенилен (моноциклический C_3-C_6 карбоцикл); где указанные алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил и карбоциклический радикалы, или отдельно или как часть другой группы, необязательно являются замещенными;

R^5 представляет собой -H;

R^6 представляет собой метил;

R^7 представляет собой $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил или $-C_2-C_8$ алкинил;

каждый R^8 является метоксигруппой;

R^9 представляет собой -H или $-C_1-C_8$ алкил;

R^{24} представляет собой -фенил;

R^{25} представляет собой $-OR^{18}$;

где R^{18} является H, гидроксильной защитной группой или прямой связью, где OR^{18} представляет =O;
 R^{26} является метилом; или их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатинны формулы D_E включают такие, в которых

R^2 представляет собой метил;

R^3 представляет собой -H или $-C_1-C_3$ алкил;

R^4 представляет собой $-C_1-C_5$ алкил;

R^5 является -H; R^6 является метилом;

R^7 представляет собой изопропил или втор-бутил;

R^8 является метоксигруппой;

R^9 является -H или $-C_1-C_8$ алкилом;

R^{24} является фенилом;

R^{25} представляет собой $-OR^{18}$;

где R^{18} является -H, гидроксильной защитной группой или прямой связью, где OR^{18} представляет =O;
 R^{26} является метилом; или их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатинны формулы D_E включают такие, в которых

R^2 является метилом или C_1-C_3 алкилом;

R^3 является -H или $-C_1-C_3$ алкилом;

R^4 представляет собой $-C_1-C_8$ алкил;

R^5 является H;

R^6 является C_1-C_3 алкилом;

R^7 является $-C_1-C_8$ алкилом;

R^8 является $-C_1-C_3$ алкоксигруппой;

R^9 является -H или $-C_1-C_8$ алкилом;

R^{24} является фенилом;

R^{25} является $-OR^{18}$;

где R^{18} является -H, гидроксильной защитной группой или прямой связью, где OR^{18} представляет =O;
 R^{26} является $-C_1-C_3$ алкилом;

или их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатинны формулы D_F включают такие, в которых

R^2 является метилом;

R^3 , R^4 и R^7 независимо выбирают из -H, $-C_1-C_{20}$ алкила, $-C_2-C_{20}$ алкенила, $-C_2-C_{20}$ алкинила, моноциклического C_3-C_6 карбоцикла, $-C_1-C_{20}$ алкилен(моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), $-C_2-C_{20}$ алкилен(моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), $-C_2-C_{20}$ алкинилен(моноциклический C_3-C_6 карбоцикл), $-C_6-C_{10}$ арил, $-C_1-C_{20}$ алкилен(C_6-C_{10} арил), $-C_2-C_{20}$ алкенилен(C_6-C_{10} арил), $-C_2-C_{20}$ алкинилен(C_6-C_{10} арил), гетероцикла, $-C_1-C_{20}$ алкилен(гетероцикл), $-C_2-C_{20}$ алкенилен(гетероцикл) или $-C_2-C_{20}$ алкинилен(гетероцикл); где указанные алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, карбоцикл, арильный и гетероциклический радикалы, или отдельно или как часть другой группы, необязательно являются замещенными;

R^5 является -H;

R^6 является метилом;

каждый R^8 является метоксигруппой;

R^9 представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил или $-C_2-C_{20}$ алкинил;

где указанный алкил, алкенил и алкинильный радикалы необязательно являются замещенными;

R^{10} необязательно замещается арилом или необязательно замещается гетероциклом;

Z представляет собой -O-, -S-, -NH- или $-NR^{12}$,

где R^{12} представляет собой $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил или $-C_2-C_{20}$ алкинил, каждый из которых необязательно является замещенным;

R^{11} представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил, $-C_2-C_{20}$ алкинил, -арил, -гетероцикл, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ или $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, где указанный алкил, алкенил, алкинил, арильный и гетероциклический радикалы необязательно являются замещенными;

m является целым числом в пределах от 1-1000 или $m=0$;

R^{13} представляет собой $-C_2-C_{20}$ алкилен, $-C_2-C_{20}$ алкенилен или $-C_2-C_{20}$ алкинилен, каждый из которых необязательно замещается;

R^{14} представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил или $-C_2-C_{20}$ алкинил, где указанный алкил, алкенильный и алкинильный радикалы необязательно являются замещенными;

в каждом случае появления R^{15} независимо представляет собой -H, -COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ алкил, $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ алкенил или $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ алкинил, где указанный алкил, алкенильный и алкинильный радикалы необязательно являются замещенными;

в каждом случае появления R^{16} независимо представляет собой -H, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_2-C_{20}$ алкенил, $-C_2-C_{20}$ алкинил или $-(CH_2)_n-COOH$, где указанный алкил, алкенил и алкинильный радикалы необязательно являются замещенными;

n является целым числом в пределах от 0 до 6;

или их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

В некоторых из этих вариантов осуществления R^{10} необязательно замещается фенилом.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых группы R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 являются незамещенными, а группы R^{10} и R^{11} представляют собой, как описано в этом документе.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых указанный алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоциклический и гетероциклический радикалы являются незамещенными.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых

R^2 представляет собой $-C_1-C_3$ алкил;

R^3 является $-H$ или $-C_1-C_3$ алкилом;

R^4 является $-C_1-C_5$ алкилом;

R^5 является $-H$;

R^6 является $-C_1-C_3$ алкилом;

R^7 является $-C_1-C_8$ алкилом;

R^8 является $-C_1-C_3$ алкоксигруппой;

R^9 является $-H$ или $-C_1-C_8$ алкилом;

R^{10} необязательно замещается фенилом;

Z представляет собой $-O-$, $-S-$ или $-NH-$;

R^{11} является, как определено в этом документе; или

их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых

R^2 является метилом;

R^3 является $-H$ или $-C_1-C_3$ алкилом;

R^4 является $-C_1-C_8$ алкилом;

R^5 является $-H$;

R^6 является метилом;

R^7 является изопропилом или втор-бутилом;

R^8 является метоксигруппой;

R^9 является $-H$ или $-C_1-C_8$ алкилом;

R^{10} необязательно замещается фенилом;

Z представляет собой $-O-$, $-S-$ или $-NH-$; и

R^{11} является, как определено в этом документе; или

их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых

R^2 является метилом;

R^3 является $-H$ или $-C_1-C_3$ алкилом;

R^4 является $-C_1-C_8$ алкилом;

R^5 является $-H$;

R^6 является метилом;

R^7 является изопропилом или втор-бутилом;

R^8 является метоксигруппой;

R^9 является $-H$ или C_1-C_8 алкилом;

R^{10} является фенилом; и

Z является $-O-$ или $-NH-$, и

R^{11} является, как определено в этом документе, предпочтительно водородом; или

их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых

R^2 является $-C_1-C_3$ алкилом;

R^3 является $-H$ или $-C_1-C_3$ алкилом;

R^4 является $-C_1-C_8$ алкилом;

R^5 является $-H$; R^6 является $-C_1-C_3$ алкилом;

R^7 является $-C_1-C_8$ алкилом;

R^8 является $-C_1-C_3$ алкоксигруппой;

R^9 является $-H$ или $-C_1-C_8$ алкилом; R^{10} является фенилом; и

Z является $-O-$ или $-NH-$ и

R^{11} является, как определено в этом документе, предпочтительно водородом; или

их фармацевтически приемлемую соль или сольватную форму.

Ауристатины формулы D_E or D_F включают такие, в которых R^3 , R^4 и R^7 независимо являются изопропилом или вторбутилом, а R^5 является $-H$. В характерных вариантах осуществления R^3 и R^4 каждый являются изопропилом, R^5 является H , и R^7 является вторбутилом. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_E or D_F включают такие, в которых R^2 и R^6 каждый являются метилом, и R^9 является H . Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_E or D_F включают такие, в которых в каждом случае R^8 представляет собой

-OCH₃. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_E or D_F включают такие, в которых R³ и R⁴ каждый являются изопропилом, R² и R⁶ каждый являются метилом, R⁵ является H, R⁷ является вторбутилом, в каждом случае R⁸ является -OCH₃, и R⁹ является H. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых Z представляет собой -O- или -NH-. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых R¹⁰ является арилом. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых R¹⁰ является -фенилом. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых Z является -O-, а R¹¹ является H, метилом или трет-бутилом. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

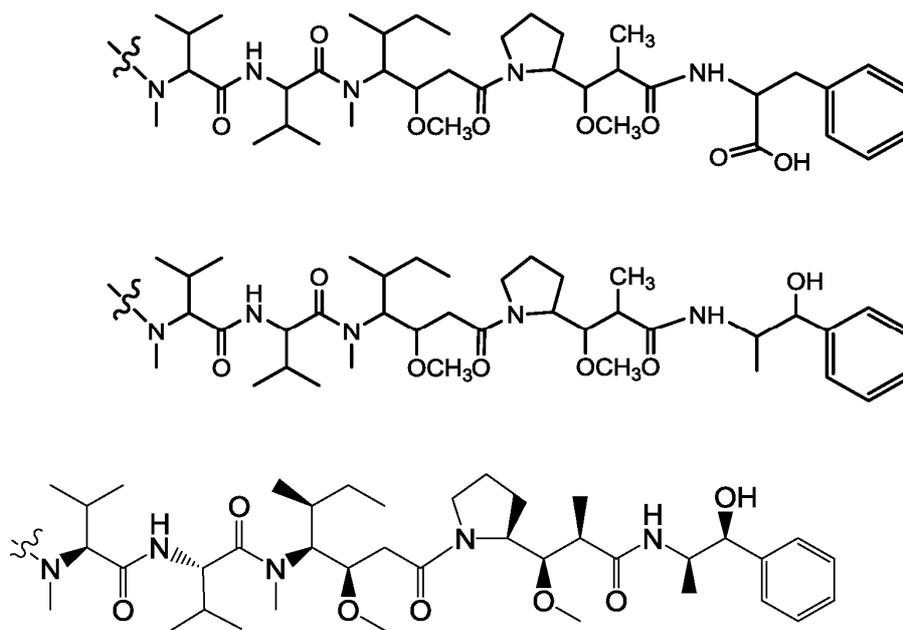
Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых, когда Z является -NH-, R¹¹ представляет собой -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, где R¹⁵ представляет собой -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, и R¹⁶ представляет собой -C₁-C₈ алкил или -(CH₂)_n-COOH. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

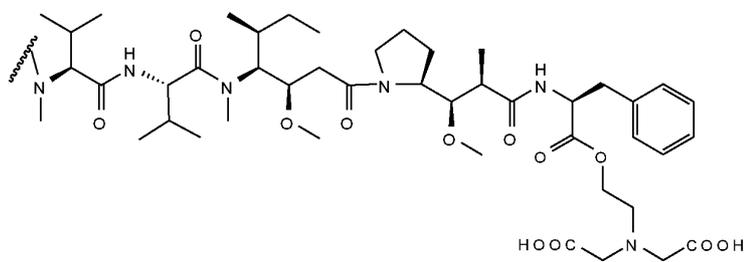
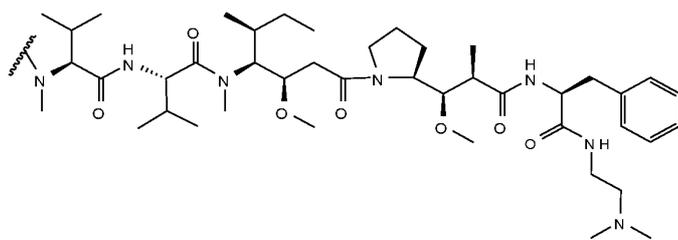
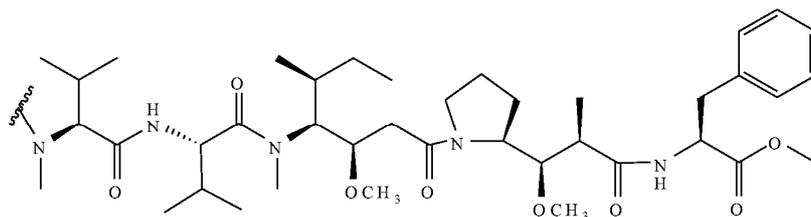
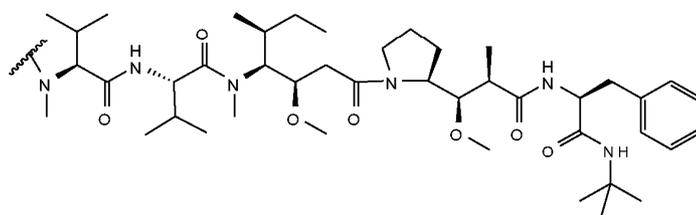
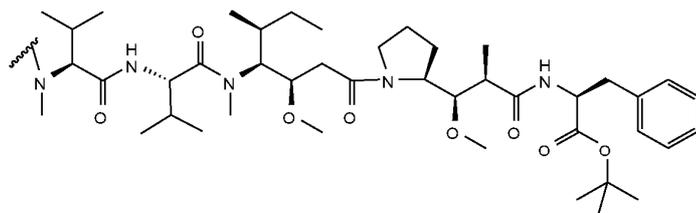
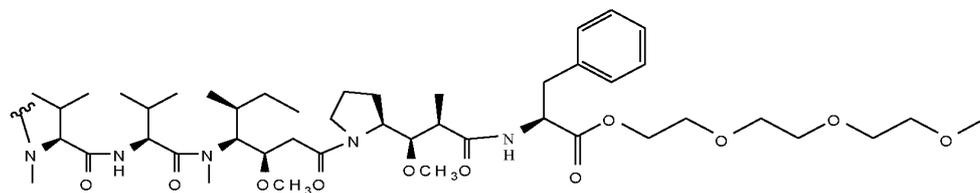
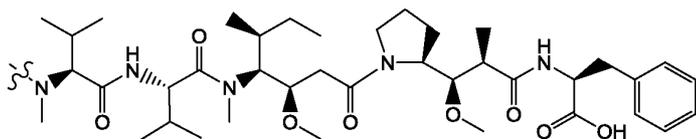
Ауристатины формулы D_F включают такие, в которых, когда Z является -NH-, R¹¹ представляет собой -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, где R¹⁵ представляет собой -(CH₂)_n-SO₃H. Остальные заместители являются как определено в этом документе.

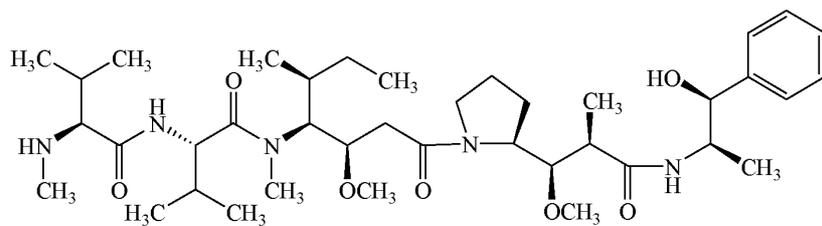
В предпочтительных вариантах осуществления, когда D является ауристатином формулы D_E, w является целым числом в пределах от 1 до 12, предпочтительно от 2 до 12, y является 1 или 2 и a предпочтительно является 1.

В некоторых вариантах осуществления, где D является ауристатином формулы D_F, a является 1, а w и y являются 0.

Типичные молекулы лекарственных средств (-D) включают молекулы лекарственных средств, имеющие следующие структуры:

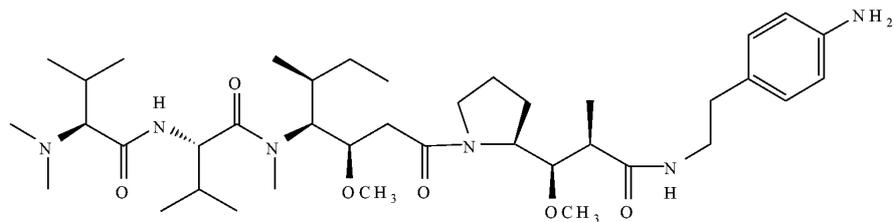




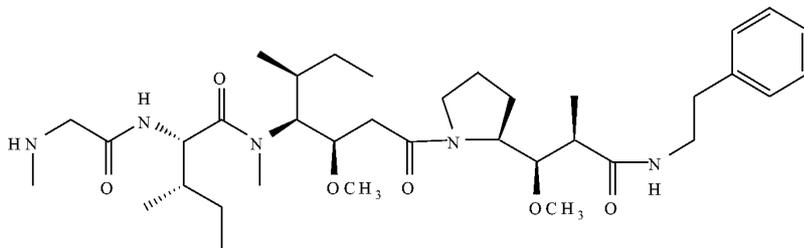


(XI)

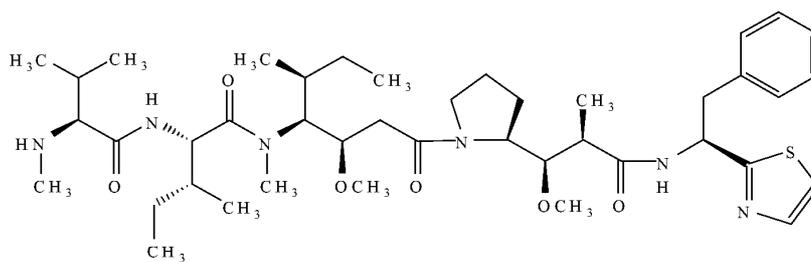
В определенных вариантах осуществления цитотоксическое или цитостатическое средство является соединением формул XII-XXI или его фармацевтически приемлемой солью:



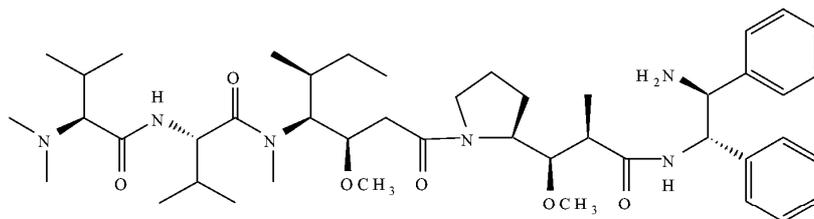
(XII)



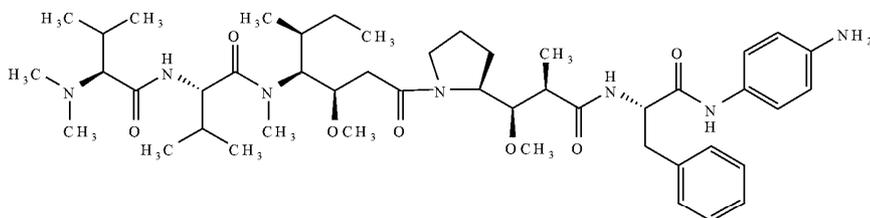
(XIII)



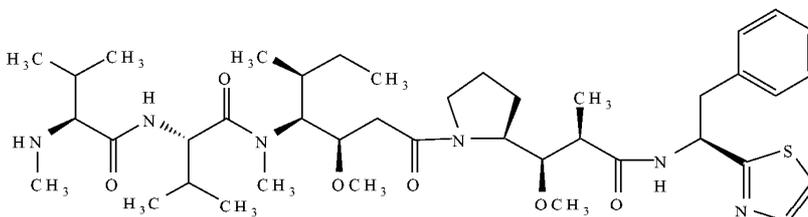
(XIV)



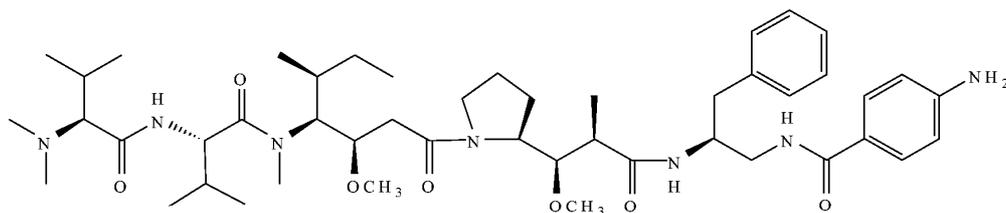
(XV)



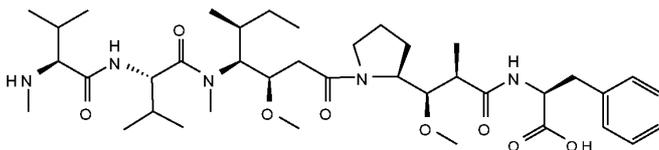
(XVI)



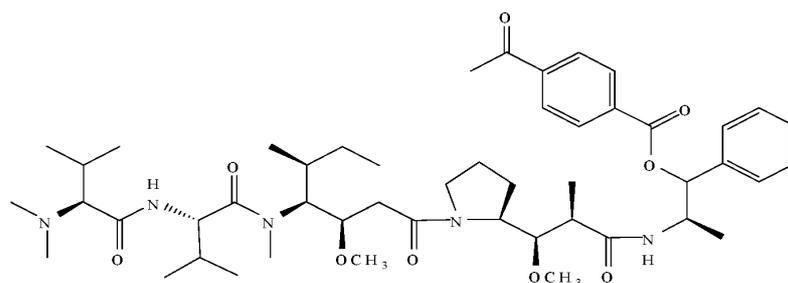
(XVII)



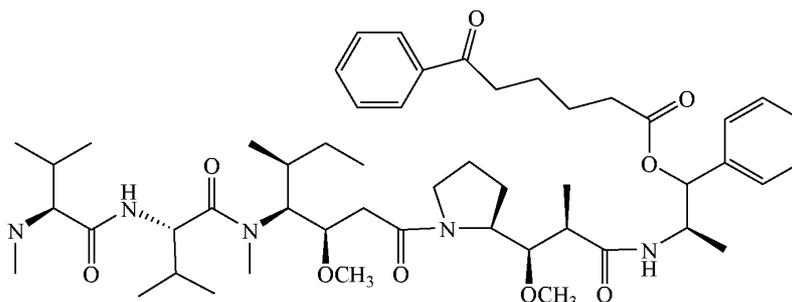
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

X) Нагрузка лекарственным средством.

Нагрузка лекарственным средством обозначается p и представляет собой среднее число молекул лекарственного средства на антитело. Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на антитело. ADCs изобретения включают наборы антител, конъюгированных с молекулами лекарственного средства, в пределах от 1 до 20 молекул. Среднее число молекул лекарственных средств на антитело в препаратах ADC после реакций конъюгации можно охарактеризовать обычными способами, такими как масс-спектрометрия, анализ ELISA. Также можно определить количественное распределение ADC в единицах p . В тех случаях, когда p составляет определенное значение, разделение, очистка и получение характеристик гомогенных ADC от ADC с нагрузкой другими лекарственными средствами может осуществляться с помощью таких методов как электрофорез.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство p может быть ограничено количеством участков присоединения на антителе. Например, когда участок присоединения представляет собой тиол цистеина, как в иллюстративных вариантах осуществления выше, на антителе могут присутствовать только одна или несколько тиольных групп цистеина или могут присутствовать только одна или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, посредством которых может быть присоединен линкер. В некоторых вариантах осуществления большая нагрузка лекарственным средством, например $p > 5$, может вызвать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю проницаемости в клетки определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC изобретения находится в пределах примерно от 1 до 8; примерно от 2 до 6; примерно от 3 до 5; примерно от 3 до 4; примерно от 3,1 до 3,9; примерно от 3,2 до 3,8; примерно от 3,2 до 3,7; примерно от 3,2 до 3,6; примерно от 3,3 до 3,8; или примерно от 3,3 до 3,7. Действительно, было показано, что для определенных ADCs оптимальное отношение молекул лекарственного средства на антитело может не превышать 8 и может составлять примерно от 2 до 5. См. США патент № 7498298 (полностью включенный в описание путем отсылки).

В некоторых вариантах осуществления в течение реакции конъюгации с антителом конъюгирует меньше молекул лекарственного средства, чем теоретический максимум. Антитело может содержать, например, остатки лизина, которые не реагируют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как обсуждается ниже. Как правило, антитела не содержат много свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеинов, которые могут связываться с молекулой лекарственного средства; в самом деле, большинство тиольных остатков цистеинов в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело может быть восстановлено в присутствии восстановителя, такого как дитиотреитол (ДТТ) или трикарбонилэтилфосфин (ТСЕР), в частично или полностью восстанавливающих условиях, чтобы получить реакционноспособные тиольные группы цистеинов. В определенных вариантах осуществления антитело помещают в денатурирующие условия для открытия реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузку (отношение лекарственное средство/антитело) ADC можно контролировать различными способами, например (i) ограничением молярного избытка промежуточного соединения лекарственное

средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничением времени или температуры реакции конъюгации и (iii) частичными или ограниченными восстанавливающими условиями для модификации тиолов цистеинов, (iv) инженерией аминокислотной последовательности антитела с помощью рекомбинантных технологий для того, чтобы модифицировать количество и положение остатков цистеина с целью контролировать количество и/или положение мест связывания линкера и лекарственного средства (например, тиоMab или тиоFab получают, как раскрывается в описании и в WO2006/034488 (полностью включенном в описание путем отсылки)).

Следует понимать, что когда более чем одна нуклеофильная группа реагирует с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, а затем с молекулой лекарственного вещества, тогда полученный продукт является смесью ADC соединений с распределением присоединенных к антителу молекул лекарственного средства от одной или более. Среднее число молекул лекарственного средства на антитело можно вычислить, исходя из смеси, методом ELISA с использованием двойной системы антител, которые являются специфическими к антителу и специфическими к лекарственному средству. Отдельные молекулы ADC можно распознать в смеси с помощью масс-спектрометрии и отделить с помощью ВЭЖХ, например хроматографии с гидрофобным взаимодействием (см., например, Hamblett, K.J., et al., "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, и toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al., "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). В определенных вариантах осуществления гомогенные ADC с одним значением нагрузки можно выделить из смеси конъюгатов с помощью электрофореза или хроматографии.

XI) Способы определения цитотоксического эффекта ADCs.

Способы определения, оказывает ли лекарственное средство или конъюгат антитело-лекарственное средство цитостатическое и/или цитотоксическое действие на клетку, известны. Как правило, цитотоксическая или цитостатическая активность конъюгата антитело-лекарственное средство может быть определена с помощью обработки клеток млекопитающего, экспрессирующих белок-мишень, конъюгатом антитело-лекарственное средство в среде для культуры клеток; культивирования клеток в течение периода времени примерно от 6 ч до 5 дней; и измерения жизнеспособности клеток. Методы анализа *in vitro* на основе клеток могут использоваться для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспаз) конъюгата антитело-лекарственное средство.

Для определения того, оказывает ли конъюгат антитело-лекарственное средство цитостатическое действие, можно использовать метод включения тимидина. Например, раковые клетки, экспрессирующие антиген-мишень, при плотности 5000 клеток/лунку 96-луночного планшета можно культивировать в течение 72-часового периода и подвергать воздействию 0,5 мкCi ³H-тимидина в течение заключительных 8 ч 72-часового периода времени. При этом измеряют включение ³H-тимидина в культуральные клетки в присутствии и при отсутствии конъюгата антитело-лекарственное средство.

Для определения цитотоксичности можно измерить некроз или апоптоз (программируемую смерть клетки). Некроз, как правило, сопровождается повышенной проницаемостью цитоплазматической мембраны; разбуханием клетки и разрывом цитоплазматической мембраны. Апоптоз в большинстве случаев отличается пузырением мембраны, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Обнаружение любого из этих эффектов на раковых клетках указывает на то, что конъюгат антитело-лекарственное средство пригоден для лечения злокачественных заболеваний.

Жизнеспособность клеток можно измерить, определив поглощение клетками красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий или ALAMAR™ синий (см., например, Page et al., 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). В таком методе анализа клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, затем клетки промывают, а оставшийся краситель, отражающий поглощение клетками красителя, измеряют спектрофотометрическим методом. Для измерения цитотоксичности также можно использовать белок-связывающий краситель сульфородамин-B (SRB) (Skehan et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

Альтернативно для оценки выживаемости и пролиферации живых (не мертвых) клеток млекопитающих с помощью количественного колориметрического анализа используется соль тетразолия, такая как МТТ, (см., например, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

Количественный анализ апоптоза можно осуществить, определив, например, фрагментацию ДНК. Доступны коммерческие фотометрические методы количественного определения фрагментации ДНК *in vitro*. Примеры таких методов анализа, включая TUNEL (с помощью которого определяют включение меченых нуклеотидов во фрагментированную ДНК) и методы анализа на основе ELISA, описаны в *Biochemica*, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Кроме того, апоптоз можно определить посредством оценки морфологических изменений в клетке. Например, как и в случае некроза, потеря целостности цитоплазматической мембраны может быть установлена посредством измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как акридиновый оранжевый или бромистый этидий). Способ определения количества апоптотических клеток описан Duke и Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., eds., 1992,

pp. 3.17.1-3.17.16). Кроме того, клетки можно пометить ДНК-красителем (например, акридиновым оранжевым, бромистым этидием или пропидий иодидом) и обнаружить клетки с конденсацией и скоплением хроматина вдоль внутренней ядерной мембраны. Для установления апоптоза можно оценить другие морфологические признаки, включая, например, конденсацию цитоплазмы, повышенную пузырчатость мембраны и сжатие клетки.

Наличие апоптотических клеток можно определить и в прикрепленных и "плавающих" компартаментах культур. Например, оба компартмента могут быть собраны посредством удаления супернатанта (культуральной среды), трипсинизации прикрепленных клеток, объединения препаратов, а затем центрифугирования после стадии промывки (например, 10 мин при 2000 об/мин) и установления апоптоза (например, измерением фрагментации ДНК). (См., например, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Действие 191P4D12 терапевтической композиции *in vivo* может быть оценено на подходящей животной модели. Например, могут использоваться ксеногенные модели рака, когда раковые эксплантаты или перевиваемые ксенотрансплантаты тканей вводятся животным с ослабленной иммунной системой, таким как бестимусные мыши или мыши линии SCID (Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). Например, патентная заявка PCT WO 98/16628 и патент США № 6107540 описывают различные модели ксенотрансплантатов рака предстательной железы человека, способные повторять развитие первичных опухолей, микрометастазов и образование остеобластных метастазов, характерных для поздней стадии болезни. Эффективность может быть предсказана с помощью методов анализа, определяющих ингибирование образования опухоли, регрессию опухоли или метастазов и т.п.

При оценке терапевтических композиций используются методы анализа *in vivo*, которые оценивают содействие развитию апоптоза. В одном варианте осуществления мышей с ксенотрансплантатами опухоли, которых лечили терапевтической композицией, можно исследовать на наличие апоптотических очагов и сравнить с нелечеными контрольными мышами с ксенотрансплантатами. Величина (степень) образования апоптотических очагов в опухолях леченых мышей дает представление о терапевтической эффективности композиции.

Терапевтические композиции, используемые при применении на практике вышеупомянутых способов, могут включаться в состав фармацевтических композиций, содержащих носитель, подходящий для желательного способа доставки. Подходящие носители включают любой материал, который при объединении с фармацевтической композицией сохраняет противоопухолевое действие терапевтической композиции и в большинстве случаев не вызывает реакции со стороны иммунной системы пациента. Примеры включают, но не ограничиваются этим, любой из целого ряда стандартных фармацевтических носителей, таких как стерильные фосфатно-солевые буферные растворы, бактериостатическая вода и т.п. (см. в целом Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Терапевтические композиции можно солубилизовать и ввести с помощью любого способа доставки терапевтической композиции в местонахождение опухоли. Потенциально эффективные способы введения включают, но не ограничиваются этим, внутривенный, парентеральный, внутрибрюшинный, внутримышечный, внутриопухолевый, внутриорганный, ортотопический и т.п. Предпочтительная композиция для внутривенной инъекции содержит терапевтическую композицию в растворе консервированной бактериостатической воды, стерильной неконсервированной воды и/или в разведенном виде в мешочках из поливинилхлорида или полиэтилена, содержащих 0,9% стерильный хлорид натрия для инъекций, USP. Терапевтические белковые препараты можно лиофилизировать и хранить в виде стерильных порошков, предпочтительно в вакууме, а затем восстанавливать в бактериостатической воде (содержащей, например, консервант бензиловый спирт) или в стерильной воде перед инъекцией.

Дозировки и протоколы введения для лечения злокачественных опухолей при использовании вышеупомянутых способов будут изменяться в зависимости от метода и конкретного злокачественного заболевания и будут зависеть от целого ряда других факторов, принимаемых во внимание в данной области техники.

ХП) Лечение злокачественной опухоли(ей), экспрессирующей 191P4D12.

Идентификация белка 191P4D12, который в норме экспрессируется в ограниченном наборе тканей, но который также экспрессируется при раковых заболеваниях, например, таких как перечисленные в табл. I, открывает целый ряд терапевтических подходов для лечения таких видов рака.

Следует отметить, что таргентная противоопухолевая терапия используется даже когда белок-мишень экспрессируется в нормальных тканях, даже в тканях жизненноважных органов. Жизненноважный орган - это орган, необходимый для поддержания жизни, такой как сердце или толстая кишка. Нежизненноважный орган - это орган, который можно удалить, после чего индивидуум все еще способен выжить. Примерами нежизненноважных органов являются яичник, молочная железа и предстательная железа.

Экспрессия белка-мишени в нормальной ткани, даже жизненноважной нормальной ткани, не отменяет пользу нацеливающегося на белок средства, как терапевтического средства для определенных видов опухолей, в которых белок также сверхэкспрессируется. Например, экспрессия в жизненноважных органах и сама по себе не является вредной. В дополнение к этому органы, рассматриваемые как несущественные, такие как предстательная железа и яичник, могут быть удалены, что не приводит к смерти. На-

конец, в некоторых жизненноважных органах не происходит нормальной экспрессии вследствие иммунной привилегии. Иммунопривилегированные органы - это органы, защищенные от крови гистогематическими барьерами и поэтому недоступные для иммунотерапии. Примерами иммунопривилегированных органов являются мозг и яичко.

Соответственно терапевтические подходы, ингибирующие активность белка 191P4D12, пригодны для пациентов, страдающих от рака, экспрессирующего 191P4D12. Эти терапевтические подходы обычно разделяются на три класса. Первый класс модулирует функцию 191P4D12, так как он имеет отношение к росту опухолевой клетки, приводя к ингибированию или задержке роста опухолевых клеток или вызывая их уничтожение. Второй класс включает различные методы ингибирования связывания или ассоциации белка 191P4D12 с его партнером по связыванию или с другими белками. Третий класс включает целый ряд способов ингибирования транскрипции гена 191P4D12 или трансляции 191P4D12 мРНК.

Соответственно раковых пациентов можно оценить по наличию и уровню экспрессии 191P4D12, предпочтительно с помощью иммуногистохимических анализов опухолевой ткани, количественной визуализации 191P4D12 или других методов, надежно показывающих наличие и степень экспрессии 191P4D12. Для этой цели предпочтительным является иммуногистохимический анализ опухолевой биопсии или операционных препаратов. Способы иммуногистохимического анализа опухолевых тканей хорошо известны в данной области техники.

XIII) 191P4D12 как мишень для терапии на основе антител.

191P4D12 является перспективной целью для терапевтической стратегии, основанной на антителах. В данной области техники известен ряд стратегий нацеливания и на внеклеточные и на внутриклеточные молекулы (см., например, уничтожение, опосредованное комплементом, и ADCC, а также использование интраантител). Так как 191P4D12 экспрессируется раковыми клетками различных линий дифференцировки по сравнению с соответствующими нормальными клетками, разрабатывается системное введение 191P4D12-иммунореактивных композиций, при котором наблюдается отличная чувствительность без токсических, неспецифических и/или нецелевых эффектов, вызванных связыванием иммунореактивной композиции с органами и тканями, не являющимися мишенями. Антитела, специфически реагирующие с доменами 191P4D12, являются пригодными для системного лечения видов рака, экспрессирующих 191P4D12, предпочтительно в виде конъюгатов антитело-лекарственное средство (т.е. ADCs), в которых конъюгат создается с токсическим веществом или терапевтическим средством.

Специалистам в данной области техники понятно, что антитела могут использоваться для специфического нацеливания и связывания с иммуногенными молекулами, такими как иммуногенная область последовательности 191P4D12, показанная на фиг. 1. Кроме того, специалистам понятно, что конъюгирование антител с цитотоксическими средствами является общепринятой практикой (см., например, Slevers et al., Blood 93:11 3678-3684 (June 1, 1999)). В том случае, когда цитотоксические и/или терапевтические средства доставляются непосредственно в клетки, например при конъюгировании их с антителами, специфическими к молекуле, экспрессируемой этими клетками (например, 191P4D12), цитотоксическое средство будет оказывать свое известное биологическое действие (т.е. цитотоксичность) на такие клетки.

В данной области техники известно большое число композиций и способов использования конъюгатов антитело-цитотоксическое средство для уничтожения клеток. В случае злокачественных опухолей типичные способы включают введение млекопитающему с опухолью биологически эффективного количества конъюгата, содержащего выбранное цитотоксическое и/или терапевтическое средство, связанное с нацеливающим агентом (например, 191P4D12 MAб, предпочтительно Ha22-2(2,4)6.1), которое связывается с экспрессированным антигеном (например, 191P4D12), доступным для связывания или локализованным на поверхности клетки. Типичным вариантом осуществления является способ доставки цитотоксического и/или терапевтического средства в клетку, экспрессирующую 191P4D12, содержащего конъюгированное с антителом цитотоксическое средство, которое иммуноспецифически связывается с эпитопом 191P4D12, при этом клетка подвергается действию конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Другим иллюстративным вариантом осуществления является способ лечения индивидуума, предположительно с метастазирующим раком, включающий стадию введения указанному индивидууму парентеральным способом фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела, конъюгированного с цитотоксическим и/или терапевтическим средством.

Иммунотерапия рака с использованием антител 191P4D12 может быть проведена в соответствии с различными подходами, которые успешно применяются при лечении других типов рака, включая, но не ограничиваясь этим, рак толстой кишки (Arlen et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138), множественную миелому (Ozaki et al., 1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari et al., 1997, Blood 90:2437-2444), рак желудка (Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), В-клеточную лимфому (Funakoshi et al., 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), лейкоз (Zhong et al., 1996, Leuk. Res. 20:581-589), колоректальный рак (Moun et al., 1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders et al., 1995, Cancer Res. 55:4398-4403) и рак молочной железы (Shepard et al., 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127). Некоторые терапевтические подходы касаются конъюгирования "оголенного" антитела с токсином или радионуклидом, такого как конъюгация Y^{91} или I^{131} с анти-CD20 антителами (например, ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp.

или Веххар™, Coulter Pharmaceuticals) соответственно, в то время как другие касаются совместного введения антител и других терапевтических средств, например герцептина™ (трастузумаб) с паклитакселом (Genentech, Inc.). В предпочтительном варианте осуществления антитела будут конъюгированы с цитотоксическим средством, см. выше, предпочтительно производным ауристатина, обозначенным ММАЕ (Seattle Genetics, Inc).

Хотя лечение 191P4D12 антителом применяется на всех стадиях рака, терапия антителами может предназначаться, в частности, для лечения распространенной злокачественной опухоли или метастатических видов рака. Лечение с помощью антител изобретения показано пациентам, получившим один или более курсов химиотерапии. Альтернативно терапия антителами изобретения комбинируется с химиотерапевтическим режимом лечения или курсом облучения при лечении пациентов, не получавших химиотерапии. Кроме того, терапия антителами может предоставить возможность использования уменьшенных дозировок сопутствующей химиотерапии, в частности для пациентов, которые плохо переносят токсичность химиотерапевтического средства. Fan et al. (Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Prewett et al. (International J. of Onco. 9:217-224, 1996), и Hancock et al. (Cancer Res. 51:4575-4580, 1991) описывает применение различных антител в сочетании с химиотерапевтическими средствами.

Моноклональные антитела 191P4D12, с помощью которых можно лечить виды рака, представленные в табл. I, включают антитела, вызывающие сильный иммунный ответ против опухоли, или антитела, являющиеся непосредственно цитотоксичными. В этом отношении 191P4D12 моноклональные антитела (MAbs) могут вызывать лизис опухолевых клеток с помощью механизмов или комплемент-опосредованной или антитело-зависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), оба из которых нуждаются в интактном Fc-фрагменте молекулы иммуноглобулина для взаимодействия эффекторной молекулы с Fc рецепторными участками на белках комплемента. В дополнение к этому, 191P4D12 MAbs, которые оказывают прямое биологическое действие на рост опухоли, являются пригодными для лечения видов рака, экспрессирующих 191P4D12. Механизмы, с помощью которых оказывают действие цитотоксические MAbs, включают ингибирование клеточного роста, модулирование дифференцировки клеток, модулирование профиля факторов ангиогенеза опухоли и индукцию апоптоза.

Механизм(ы), за счет которых отдельное 191P4D12 MAб оказывает противоопухолевое действие, оцениваются с помощью использования любого количества методов анализа *in vitro*, которые устанавливают клеточную смерть, таких как ADCC, комплемент-опосредованный лизис клетки и так далее, как общеизвестно в данной области техники.

Таким образом, предпочтительными моноклональными антителами, использованными в терапевтических способах изобретения, являются или полностью человеческие антитела, или антитела, специфически связывающиеся с целевым антигеном 191P4D12 с высокой аффинностью.

XIV) Смесь 191P4D12 ADC.

Терапевтические способы изобретения рассматривают введение отдельных 191P4D12 ADCs, а также комбинаций, или смесей, различных MAbs (т.е. 191P4D12 MAbs или MAbs, которые связывают другой белок). Такая смесь MAб может иметь определенные преимущества в виду того, что она содержит MAbs, нацеленные на разные эпитопы и эксплуатирующие разные эффекторные механизмы, или смешивает непосредственно цитотоксичные MAbs с MAbs, которые основываются на функциональности иммунного эффектора. Такие MAbs в комбинации могут демонстрировать синергические терапевтические эффекты. Кроме того, 191P4D12 MAbs могут вводиться параллельно с другими терапевтическими воздействиями, включая, но не ограничиваясь этим, разнообразные химиотерапевтические и биологические средства, блокаторы андрогенов, иммуномодуляторы (например, IL-2, GM-CSF), хирургическую операцию или облучение. В предпочтительном варианте осуществления 191P4D12 MAbs вводятся в конъюгированной форме.

Композиции 191P4D12 ADC вводятся любым путем, способным доставить антитела в опухолевую клетку. Способы введения включают, но не ограничиваются этим, внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, внутриопухолевый, внутрикожный и тому подобные. В большинстве случаев лечение включает повторное введение 191P4D12 ADC препарата через приемлемый путь введения, такой как внутривенная инъекция (IV), как правило, в дозе, включая, но не ограничиваясь этим, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мг/кг веса тела. В общем, дозы в пределах 10-1000 мг MAб в неделю являются эффективными и хорошо переносятся.

Исходя из клинического опыта применения герцептина® (трастузумаба) при лечении метастатического рака молочной железы первоначальная нагрузочная доза приблизительно 4 мг/кг веса тела пациента IV, с последующими еженедельными дозами около 2 мг/кг IV препарата MAб представляет подходящий режим дозирования. Предпочтительно первоначальная нагрузочная доза вводится с помощью 90-минутной или более продолжительной инфузии. Периодическая поддерживающая доза вводится в виде 30-минутной или более продолжительной инфузии, при условии, что первоначальная доза была хорошо перенесена пациентом. Специалистам ясно, что на идеальный режим дозирования в отдельном случае могут оказывать влияние различные факторы. Такие факторы включают, например, аффинность связывания и время полужизни использованных MAbs, степень экспрессии 191P4D12 у пациента, величину цирку-

лирующего "слущивающегося" (shed) 191P4D12 антигена, уровень желательной равновесной концентрации антител, повторение лечения и действие химиотерапевтических или других средств, использованных в комбинации с методом лечения изобретения, а также состояние здоровья конкретного пациента.

Необязательно пациентов следует оценивать по уровням 191P4D12 в определенном образце (например, уровням циркулирующего 191P4D12 антигена и/или 191P4D12 экспрессирующих клеток) для того, чтобы лучше установить наиболее эффективный режим дозирования и т.д. Такие оценки используются для мониторинга результатов на всем протяжении терапии, а также для того, чтобы оценить терапевтический успех в комбинации с оценкой других параметров (например, цитологии мочи, и/или уровнем ImmunoCyt при лечении рака мочевого пузыря, или, по аналогии, уровнем PSA в сыворотке при лечении рака предстательной железы).

Цель настоящего изобретения - предоставить 191P4D12 ADCs, которые ингибируют или задерживают рост опухолевых клеток, экспрессирующих 191P4D12. Дополнительная цель этого изобретения - предоставить способы ингибирования ангиогенеза и других биологических функций и, таким образом, уменьшить рост опухоли у млекопитающих, предпочтительно людей, используя 191P4D12 ADCs, и, в частности, используя такие 191P4D12 ADCs в комбинации с другими лекарственными средствами или иммунологически активными методами лечения.

XV) Комбинированная терапия.

В одном варианте осуществления наблюдается синергизм в тех случаях, когда опухоли, включая опухоли человека, лечат 191P4D12 ADCs в сочетании с химиотерапевтическими средствами или облучением или их комбинацией. Другими словами, ингибирование роста опухоли с помощью 191P4D12 ADC увеличивается больше, чем ожидалось, при использовании комбинации с химиотерапевтическими средствами или облучением или их комбинации. Синергизм может проявляться, например, более значительным ингибированием роста опухоли при комбинированном лечении, чем можно было бы ожидать от лечения только 191P4D12 ADC, или аддитивным эффектом лечения 191P4D12 ADC и химиотерапевтическим средством или облучением.

Предпочтительно синергизм проявляется ремиссией рака там, где ремиссия не предполагалась при лечении или 191P4D12 ADC или аддитивной комбинацией 191P4D12 ADC и химиотерапевтического средства или облучения.

Способ ингибирования роста опухолевых клеток при использовании 191P4D12 ADC и комбинации химиотерапии или облучения или и того и другого включает введение 191P4D12 ADC до, во время или после начала химиотерапии или радиационной терапии, а также любой их комбинации (т.е. до и во время, до и после, во время и после или до, во время и после начала химиотерапии и/или радиотерапии). Например, 191P4D12 ADC, как правило, вводится между 1 и 60 днями, предпочтительно между 3 и 40 днями, более предпочтительно между 5 и 12 днями до начала радиационной терапии и/или химиотерапии. Тем не менее, в зависимости от протокола лечения и конкретных потребностей пациента способ осуществляется таким образом, чтобы обеспечить самое эффективное лечение и, в конечном счете, продлить жизнь пациента.

Введение химиотерапевтических средств может осуществляться множеством способов, включая системное введение парентеральным и энтеральным путем. В одном варианте осуществления 191P4D12 ADCs и химиотерапевтическое средство вводятся как отдельные молекулы. Конкретные примеры химиотерапевтических средств или химиотерапии включают цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, мехлоретамин (мустарген), стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубин (адриамицин), даунорубин, прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксель (таксол), доцетаксель (таксотер), алдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, дакарбазин, флоксуридин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, интерферон альфа, леупролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митотан, пегаспаргазу, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепу, урамустин, винорельбин, гемцитабин, хлорамбуцил, таксол и их комбинации.

Источник излучения, используемый в комбинации с 191P4D12 ADC, может быть или внешним или внутренним по отношению к пациенту, которого следует лечить. В том случае, когда источник является внешним по отношению к пациенту, терапия называется наружная дистанционная лучевая терапия (EBRT). Когда источник является внутренним по отношению к пациенту, терапия называется брахитерапия (BT).

Описанные выше терапевтические режимы могут сочетаться с дополнительными средствами лечения рака и/или режимами, например дополнительной химиотерапией, противоопухолевыми вакцинами, ингибиторами сигнальной трансдукции, средствами, используемыми при лечении аномального роста клеток или рака, антителами (например, анти-CTLA-4 антителами, как описано в WO/2005/092380 (Pfizer)) или другими лигандами, ингибирующими опухолевый рост путем связывания с IGF-1R, и цитокинами.

Когда млекопитающее подвергается дополнительной химиотерапии, могут использоваться химиотерапевтические препараты, описанные выше. В дополнение к этому могут использоваться ингибиторы

факторов роста, модификаторы биологического ответа, противогормональная терапия, селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERMs), ингибиторы ангиогенеза и антиандрогены. Например, могут использоваться антигормоны, такие как антиэстрогены, например, нолвадекс (тамоксифен), или антиандрогены, такие как касодекс (4'-циано-3-(4-фторфенилсульфонил)-2-гидрокси-2-метил-3'-(трифторметил)пропионанилид).

Вышеупомянутые терапевтические подходы можно комбинировать с любым из большого разнообразия режимов хирургического, терапевтического или радиационного лечения. Терапевтические подходы изобретения могут дать возможность применения уменьшенных дозировок химиотерапии (или других видов терапии) и/или менее частого введения, что является преимуществом для всех пациентов и, в частности, для тех, которые плохо переносят токсичность химиотерапевтических средств.

XVI) Наборы/Готовые изделия.

Для практического применения в лабораторных, прогностических, профилактических, диагностических и терапевтических целях, описанных в данном документе, в объеме изобретения включаются наборы. Такие наборы могут включать носитель, упаковку или контейнер, который может подразделяться на один или более контейнеров, таких как пузырьки, пробирки и тому подобное, каждый контейнер(ы) содержит один из определенных элементов, предназначенных для использования в способе, вместе с этикеткой или вкладышем, содержащим инструкции по применению, такому как применение, описанное в этом документе. Например, контейнер(ы) может содержать антитело, которое является меченым или может быть помечено обнаружимым образом. Наборы могут включать контейнер, содержащий молекулу лекарственного средства. Набор может включать все или часть аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 2 или 3, или их аналоги, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую такие аминокислотные последовательности.

Как правило, набор изобретения содержит контейнер, описанный выше, и один или более других контейнеров, связанных с этим контейнером, которые содержат материалы, желательные с коммерческой и потребительской точек зрения, включая буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы; носитель, упаковка, контейнер, пузырек и/или пробирка имеет маркировку с перечнем содержимого и/или инструкциями по применению, и листок-вкладыш с инструкциями по применению.

Этикетка может находиться на контейнере или вместе с контейнером, чтобы указать, что композиция используется для специфического лечения или нетерапевтического применения, такого как прогностическое, профилактическое, диагностическое или лабораторное применение, а также может содержать указания относительно применения *in vivo* или *in vitro*, как описано в данном документе. Указания и/или другая информация также может содержаться на вкладыше(ах) или этикетке(ах), которые включаются в набор. Этикетка может находиться на контейнере или быть соединена с контейнером. Этикетка может находиться на контейнере, когда буквы, числа или другие символы, образующие этикетку, выдавлены или вытравлены на самом контейнере; этикетка может быть соединена с контейнером, когда он находится внутри коробки (тары) или носителя, который также имеет контейнер, например как листок-вкладыш. Этикетка может указывать, что композиция используется для диагностики, лечения, профилактики или предсказания состояния, такого как злокачественная опухоль ткани, представленного в табл. I.

Термины "набор" и "готовое изделие" могут использоваться как синонимы.

В другом варианте осуществления изобретения предоставляется готовое изделие(я), содержащее композиции, такие как антитело(а) или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADCs) например, материалы, пригодные для диагностики, прогнозирования, профилактики и/или лечения злокачественных опухолей тканей, таких как представленные в табл. I. Как правило, готовое изделие содержит по меньшей мере один контейнер и по меньшей мере одну этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, пузырьки, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло, металл или пластик. Контейнер может содержать аминокислотную последовательность(и), небольшую молекулу(ы), нуклеиновокислотную последовательность(и), клеточную популяцию(и) и/или антитело(а). В другом варианте осуществления контейнер содержит антитело, его связывающий фрагмент или специфический связывающий белок для использования при оценке экспрессии белка 191P4D12 в клетках и тканях или для соответствующих лабораторных, прогностических, диагностических, профилактических и терапевтических целей; показания и указания для такого применения могут включаться или входить в комплект такого контейнера, как и реагенты и другие композиции или приспособления, служащие для этих целей.

Альтернативно контейнер может содержать композицию, эффективную при лечении, диагностировании, прогнозировании или профилактике состояния, и может иметь стерильный входной порт (например, контейнер может представлять собой мешочек с внутривенным раствором или флакон, имеющий пробку, которую можно проколоть иглой для подкожной инъекции). Активным веществом в композиции может являться антитело, способное специфически связываться с 191P4D12 или конъюгат антитело-лекарственное средство, специфически связывающийся с 191P4D12.

Готовое изделие может дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-буферный раствор, раствор Рингера и/или раствор декстрозы. Он может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с

точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, мешалки, иглы, шприцы и/или листки-вкладыши с указаниями и/или инструкциями по применению.

Примеры

Далее различные аспекты изобретения дополнительно описываются с помощью нескольких примеров, ни один из которых не имеет целью ограничить объем изобретения.

Пример 1. 191P4D12 антиген.

Экспрессия гена 191P4D12 была обнаружена с помощью методов супрессионной вычитающей гибридации (SSH), известных в данной области техники. Последовательность 191P4D12 SSH из 223 п.о. была установлена из опухоли мочевого пузыря за вычетом кДНК, выделенной из пула из девяти (9) нормальных тканей с помощью стандартных методов. Клон полноразмерной кДНК для 191P4D12 был выделен из библиотеки кДНК рака мочевого пузыря. кДНК имеет 3464 п.о. в длину и кодирует 510 аминокислот ORF (см. фиг. 1). Ген 191P4D12 демонстрирует гомологию с геном Nectin-4. Дополнительно см. США 2004/0083497 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) и PCT публикацию WO2004/016799 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA). Иллюстративные воплощения антигена 191P4D12 см. на фиг. 1.

Пример 2. Получение 191P4D12 моноклональных антител (MAbs).

В одном варианте осуществления терапевтические моноклональные антитела ("MAbs") к вариантам 191P4D12 и 191P4D12 включают такие, которые реагируют с эпитопами, специфическими для каждого белка или специфическими к общим между вариантами последовательностям, которые могут связываться, интернализировать, нарушать или модулировать биологическую функцию 191P4D12 или 191P4D12 вариантов, например тех, которые могут нарушать взаимодействие с лигандами, субстратами и партнерами по связыванию. Иммуногены для получения таких MAbs включают предназначенные для того, чтобы кодировать или содержать внеклеточные домены или всю последовательность белка 191P4D12, участки, предположительно содержащие функциональные мотивы, и участки вариантов белка 191P4D12, предположительно являющиеся антигенными, если исходить из компьютерного анализа аминокислотной последовательности. Иммуногены включают пептиды и рекомбинантные белки, такие как tag5-191P4D12, полученный очищенный белок клеток млекопитающих, содержащий аффинную метку His. В дополнение к этому для иммунизации мышей используются клетки, созданные для того, чтобы экспрессировать высокие уровни 191P4D12, таких как RAT1-191P4D12 или 300.19-191P4D12.

MAbs к 191P4D12 были получены с помощью технологии ксеномыши Xenomouse® (Amgen Fremont), когда локусы мышинной тяжелой и каппа легкой цепи были инактивированы и была вставлена большая часть локусов тяжелой и каппа легкой цепи иммуноглобулина человека. MAб, обозначенные Ha22-2(2,4)6.1, были получены в результате иммунизации продуцирующих человеческий $\gamma 1$ ксеномышей (XenoMice) с помощью рTag5/mychis-191P4D12 (аминокислоты 23-351).

191P4D12 MAб Ha22-2(2,4)6.1 специфически связывается с белком рTag5/mychis-191P4D12 с помощью ELISA, а также рекомбинантными клетками, экспрессирующими 191P4D12, и несколькими линиями раковых клеток, экспрессирующими 191P4D12.

Гибридома, продуцирующая антитело, обозначенное Ha22-2(2,4)6.1, была послана (через службу Федерал-Экспресс) в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 18 августа 2010 и получила инвентарный номер PTA-11267.

Кодирующие последовательности ДНК для 191P4D12 MAб Ha22-2(2,4)6.1 были определены после выделения мРНК из соответствующих клеток гибридомы с помощью реагента Тризол (Life Technologies, Gibco BRL).

Нуклеиновокислотные переменные последовательности тяжелой и легкой цепей анти-191P4D12 Ha22-2(2,4)6.1 были секвенированы из клеток гибридомы с помощью следующего протокола. Клетки гибридомы, секретирующие Ha22-2(2,4)6.1, лизировали с помощью реагента Тризол (Life Technologies, Gibco BRL). Выделяли и количественно оценили общую РНК. Первую цепь кДНК получали из тотальной РНК с использованием олиго (dT)12-18 праймирования с помощью системы Gibco-BRL Superscript Preamplification. Первую цепь кДНК амплифицировали с использованием праймеров переменной тяжелой цепи иммуноглобулина человека и праймеров переменной легкой цепи иммуноглобулина человека. ПЦР-продукты были секвенированы и определены переменные участки тяжелой и легкой цепи.

Нуклеиновокислотные и аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи перечислены на фиг. 2 и 3. Выравнивание Ha22-2(2,4)6.1 MAб и зародышевой линии Ig человека представлено на фиг. 4А, В.

Пример 3. Экспрессия Ha22-2(2,4)6.1 с использованием методов рекомбинантной ДНК.

Для рекомбинантной экспрессии Ha22-2(2,4)6.1 MAб в трансфицированных клетках последовательности переменной тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1 MAб были клонированы выше последовательностей тяжелой цепи IgG1 человека и константных областей легкой цепи IgK человека соответственно. Полные кассеты Ha22-2(2,4)6.1 MAб тяжелой цепи и легкой цепи человека были клонированы ниже CMV промотор/энхансера в клонирующий вектор. Сайт полиаденилирования был включен ниже последовательности, кодирующей MAб. Конструкты, экспрессирующие рекомбинантное Ha22-2(2,4)6.1 Mab, были трансфицированы в клетки CHO. Ha22-2(2,4)6.1 Mab, секретируемое рекомбинантными клет-

ками, оценивали в отношении связывания с 191P4D12, расположенным на клеточной поверхности, с помощью проточной цитометрии (фиг. 5А). RAT-контроль и клетки RAT-191P4D12 окрашивали Ha22-2(2,4)6.1 Mab, полученными или из гибридомы или из клеток CHO, трансфицированных векторными конструктами тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Связывание детектировали с помощью проточной цитометрии.

Результаты показывают, что рекомбинантно экспрессированные на клетках CHO Ha22-2(2,4)6.1 связывают 191P4D12 подобно Ha22-2(2,4)6.1, выделенным из гибридомы. Ha22-2(2,4)6.1 Mab, секретированное рекомбинантными клетками, также было оценено в отношении связывания с рекомбинантным белком 191P4D12 с помощью ELISA. Как видно на фиг. 5В, связывание Ha22-2(2,4)6.1 с белком 191P4D12 было одинаковым между Mab, полученными из клеток CHO и из клеток гибридомы.

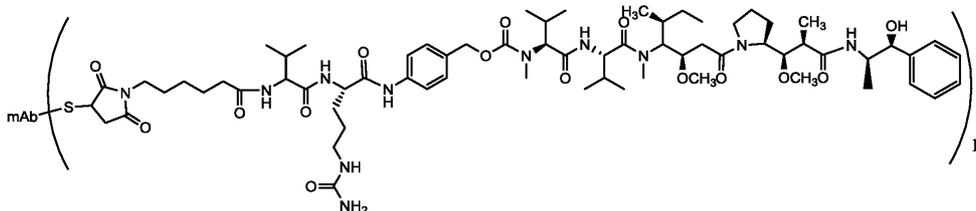
Пример 4. Конъюгирование антитела Ha22-2(2,4)6.1 МАb с лекарственным препаратом.

Ha22-2(2,4)6.1 Mab (фиг. 2) было конъюгировано с производным ауристинина, обозначенным MMAE (формула XI) с использованием линкера vc (Val-Cit), описанного в этом документе, для создания конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) изобретения, обозначенного Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE, с помощью следующих протоколов. Конъюгирование vc (Val-Cit) линкера с MMAE (Seattle Genetics, Inc., Сиэтл, Вашингтон) осуществляли с помощью общего способа, представленного в табл. IV, чтобы получить цитотоксический vcMMAE (смотри патент США № 7659241).

Затем, был получен конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) изобретения, обозначенный Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE, с использованием следующих протоколов.

Коротко, к раствору Ha22-2(2,4)6.1Mab 15 мг/мл в 10 мМ ацетате при значении pH 5,0, прибавили 1% сорбит, 3% L-аргинин в 20% объема 0,1 М ТрисCl при pH 8,4, 25мМ EDTA и 750 мМ NaCl, чтобы отрегулировать pH раствора до значения 7,5, 5мМ EDTA и 150 мМ хлорид натрия. Затем Mab частично восстанавливали добавлением 2,3 молярных эквивалентов TCEP (относительно молей Mab) и затем перемешивали при 37°C в течение 2 ч. Затем частично восстановленный раствор Mab охлаждали до 5°C и добавляли 4,4 молярных эквивалентов vcMMAE (относительно молей антитела) в виде 6% (об./об.) раствора DMSO. Смесь перемешивали в течение 60 мин при 5°C, затем в течение 15 дополнительных минут после добавления 1 молярного эквивалента N-ацетилцистеина относительно vcMMAE. Избыток гашеного vcMMAE и другие компоненты реакции удаляли ультрафильтрацией/диалитацией конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) с 10 объемами 20 мМ гистидина, pH 6,0.

Полученный конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) обозначается Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE и имеет следующую формулу:



где Mab представляет собой Ha22-2(2,4)6.1 (фиг. 2 и 3) и p является числом от 1 до 8. Значение p конъюгата антитело-лекарственное средство, установленное в этом примере, составляло примерно 3,8.

Пример 5. Характеристика Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, связывающие 191P4D12, были получены с помощью методов, представленных в примере, озаглавленном "Конъюгирование антитела Ha22-2(2,4)6.1 Mab с лекарственным препаратом", и были отобраны, идентифицированы и охарактеризованы с помощью комбинации методов, известных в данной области техники.

А. Определение аффинности с помощью FACS.

Была исследована аффинность связывания Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с 191P4D12, экспрессированным на поверхности клеток РС3-человек-191P4D12, РС3-циномолгус-191P4D12 и РС3-крыса-191P4D12 соответственно. Коротко, одиннадцать (11) разведений Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE инкубировали с каждым из типов клеток (50000 клеток на лунку) в течение ночи при 4°C при окончательной концентрации от 160 до 0,011 нМ. В конце инкубации клетки промывали и инкубировали с антителами обнаружения анти-hlgG-PE в течение 45 мин при 4°C. После отмывания несвязанных антител обнаружения клетки анализировали с помощью FACS. Были получены средние значения интенсивности флуоресценции (MFI), перечисленные на фиг. 6-8. Значения MFI вводили в программу Graphpad Prism и анализировали с использованием уравнения одного участка связывания (one site binding) (гипербола) $Y = V_{max} \times X / (Kd + X)$, чтобы получить Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE кривые насыщения, представленные также на фиг. 6-8 соответственно. V_{max} представляет собой значение MFI при максимальном связывании Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с 191P4D12; Kd - аффинность связывания Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE, которая представляет собой концентрацию Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE, необходимую для достижения полумаксимального связывания.

Вычисленная аффинность (Kd) Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE к 191P4D12, экспрессированному на по-

верхности клеток РС3-человек-191P4D12, РС3-циномолгус-191P4D12 и РС3-крыса-191P4D12 соответственно составляет 0,69 нМ (фиг. 6); 0,34 нМ (фиг. 7) и 1,6 нМ (фиг. 8).

В. Определение аффинности с помощью SPR.

Аффинность Ha22-2(2,4)6.1 MAб и Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE к очищенному рекомбинантному 191P4D12 (ECD аминокислоты 1-348) была исследована с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIAcore). Коротко, козел-античеловек Fc γ поликлональные Abs (Jackson Immuno Research Labs, Inc.) были ковалентно иммобилизованы на поверхности CM5 сенсорного чипа (Biacore). Затем очищенные Ha22-2(2,4)6.1 MAб или Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE были захвачены на поверхности указанного чипа. В среднем приблизительно 300 RU тестируемых Ha22-2(2,4)6.1 MAб или Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE было захвачено в каждом цикле. После этого серия из пяти - шести разведений рекомбинантного 191P4D12 (ECD аминокислоты 1-348) в пределах от 1 до 100 нМ было впрыснуто на такую поверхность, чтобы получить кривые связывания (сенсограммы), которые затем были обработаны и в целом соответствуют 1:1 модели взаимодействия с использованием программы BIAevaluation 3.2 и программного обеспечения CLAMP (Myszka и Morton, 1998) (фиг. 22). Табл. V суммирует константы скорости ассоциации и диссоциации, а также аффинность Ha22-2(2,4)6.1 MAб и Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE к рекомбинантному 191P4D12 (ECD аминокислоты 1-348).

С. Картирование домена Ha22-2(2,4)6.1 Mab.

Чтобы картировать сайт связывания Ha22-2(2,4)6.1 MAб со специфическим доменом белка 191P4D12, было получено несколько Rat1(E) рекомбинантных клеточных линий, экспрессирующих такие домены (или их комбинацию) (табл. VI). Связывание Ha22-2(2,4)6.1 с клеточной поверхностью оценивали с помощью FACS, используя стандартные протоколы. Как показано на фиг. 10, Ha22-2(2,4)6.1 MAб связывается с клетками, экспрессирующими VC1 домен, а также диким типом 191P4D12, но не с клетками, экспрессирующими C1C2 домен. В дополнение к этому другое 191P4D12 MAб, названное Ha22-8e6.1, узнает C1C2 домен 191P4D12 на клеточной поверхности, но не домен VC1. Из этого можно сделать вывод, что сайт связывания Ha22-2(2,4)6.1 MAб располагается в 1-147 aa домене 191P4D12, но не каждое MAб, связывающееся с 191P4D12, узнает этот домен.

Чтобы дополнительно подтвердить результаты, представленные на фиг. 10, проводили вестерн-блоттинг. Коротко, весь внеклеточный участок 191P4D12 (полной длины), а также специфические домены, представленные в табл. VI, были экспрессированы в клетках 293T как мышинные Fc-гибридные белки и очищены. Козлиные антимышь-HRP использовали в качестве контроля. Как показано на фиг. 11, при анализе с помощью SDS-PAGE (в невозстанавливающих условиях) и мечении Ha22-2(2,4)6.1-биотином, а затем стрептавидином-HRP, обнаруживаются дорожки, соответствующие полноразмерному 191P4D12 (дорожка 1), V (дорожка 2) и VC1 (дорожка 3) гибридным конструктам, но не C1C2 гибриднему конструкту (дорожка 4). Эти результаты дополнительно подтверждают, что эпитоп связывания для Ha22-2(2,4)6.1 MAб располагается в пределах 1-147 aa домена 191P4D12.

Пример 6. Клеточная цитотоксичность, опосредованная Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE.

Способность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE опосредовать 191P4D12-зависимую цитотоксичность оценивали на клетках РС3, созданных для экспрессии 191P4D12 человека, 191P4D12 цинномолгуса и 191P4D12 крысы. Коротко, клетки РС3-Neo, РС3-человек-191P4D12, РС3-циномолгус-191P4D12 или РС3-крыса-191P4D12 клетки (1500 клеток/лунку) высевали в 96-луночные планшеты в 1 день. На следующий день к каждой лунке добавили равный объем среды, содержащей указанную концентрацию Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE или контрольного Mab, конъюгированного с vcMMAE (т.е. контроль-vcMMAE). Затем клетки инкубировали в течение 4 дней при 37°C. В конце периода инкубации к каждой лунке добавили аламар синий и продолжали инкубирование в течение дополнительных 4 ч. Получаемую флуоресценцию обнаруживали с помощью ридера Biotek plate при длине волны возбуждения 620 нм и длине волны излучения 540 нм.

Результаты, представленные на фиг. 9A-D, показывают, что Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE оказывал цитотоксическое действие на клетки РС3-человек-191P4D12 (фиг. 9A), РС3-циномолгус-191P4D12 (фиг. 9B) и РС3-крыса-191P4D12 (фиг. 9C), в то время как контрольный IgG человека, конъюгированный с vcMMAE, не оказывал действия. Специфичность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE была дополнительно продемонстрирована отсутствием токсичности в отношении клеток РС3-Neo, которые не экспрессируют 191P4D12 (фиг. 9D). Таким образом, эти результаты показывают, что Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE может селективно доставлять цитотоксическое лекарственное средство в клетки, экспрессирующие 191P4D12, что приводит к их уничтожению.

Пример 7. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE ингибирует рост опухолей *in vivo*.

Значительная экспрессия 191P4D12 на поверхности клеток опухолевых тканей, наряду с ограниченной экспрессией в нормальных тканях, делает 191P4D12 хорошей мишенью для терапии с использованием антител и так же терапии с помощью ADC. Соответственно была оценена терапевтическая эффективность Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE на мышинных моделях ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря, легкого, молочной железы и поджелудочной железы.

Действие конъюгата антитело-лекарственное средство на рост опухоли и образование метастазов

исследовали на мышинных моделях ксенотрансплантатов рака (например, подкожной и ортотопической).

Подкожные (s.c.) опухоли получали инъекцией 5×10^4 - 10^6 раковых клеток, смешанных при разведении 1:1 с Matrigel (Collaborative Research), в правый бок самцов мышей SCID. Чтобы проверить действие ADC на образование опухоли, инъекции ADC начинали в тот же самый день, когда проводилась инъекция опухолевых клеток. В качестве контроля мышам вводили или очищенный человеческий IgG или PBS; или очищенные Mab, которые узнавали несоответствующий антиген, не экспрессирующийся на клетках человека. В предварительных исследованиях не обнаружено различий между действием контрольного IgG или PBS на рост опухоли. Размеры опухолей определяли с помощью штангенциркуля, при этом объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером. Мышей с подкожными опухолями больше чем 1,5 см в диаметре забивали.

Опухоль яичника часто метастазирует и растет внутри брюшной полости.

Соответственно, для внутрибрюшинного роста рака яичника у мышей делается инъекция 2 млн клеток прямо в брюшную полость самок мышей. Общее состояние здоровья, физическую активность и внешний вид мышей контролировали до момента умирания. После умерщвления исследовали брюшную полость с целью определения опухолевой массы и брали на анализ легкие, чтобы оценить метастазирование в удаленные области. Альтернативно смерть могла использоваться в качестве конечной точки. Мышей делили на группы в соответствии с видом лечения - или 191P4D12 или контрольными Mabs, которые вводили с помощью внутрибрюшинной инъекции (i.p).

Преимуществом моделей ксенотрансплантатов опухолей является возможность исследовать неоваскуляризацию и ангиогенез. Рост опухоли отчасти зависит от развития новых кровеносных сосудов. Хотя источником происхождения капиллярной системы и развития кровеносной сети является хозяин, инициация и структура новообразованных сосудов регулируется ксенотрансплантатом опухоли Davidoff et al., Clin Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik et al., Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20:1295). Действие антитела и небольшой молекулы на неоваскуляризацию исследуется в соответствии с методами, известными в данной области техники, такими как ИНС-анализ опухолевых тканей и окружающей их микросреды.

Ha22-2(2,4)6.1ADC ингибирует формирование ксенотрансплантатов рака легкого, мочевого пузыря, молочной железы и поджелудочной железы. Эти результаты показывают полезность Ha22-2(2,4)6.1ADC при лечении местной и распространенной стадий рака и предпочтительно видов рака, представленных в табл. I. 191P4D12 ADCs.

Моноклональные антитела были получены к 191P4D12, как описано в примере, озаглавленном "Получение 191P4D12 моноклональных антител (MAbs)." Затем MAbs конъюгируют с токсином, как описано в примере, озаглавленном "Конъюгирование антитела Ha22-2(2,4)6.1 Mab с лекарственным препаратом" с получением Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE. Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE охарактеризовали с помощью FACS и других методов, известных в данной области техники, чтобы определить их способность связываться с 191P4D12.

Линии клеток и ксенотрансплантаты.

Клетки BT-483 и HPAC поддерживали в среде DMEM, с добавлением L-глутамина и 10% FBS, как известно в данной области техники. Ксенотрансплантаты AG-B8, AG-Panc4, AG-Panc2, AG-B1, AG-L4 и AG-Panc3 поддерживали с помощью последовательного культивирования на мышах линии SCID. Оценка Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE Mab на подкожной модели ксенотрансплантата рака легкого человека AG-L4 на мышах SCID.

В этом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака легкого AG-L4 поддерживали серийными пассажами на мышах SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и подвергали ферментативному расщеплению на одноклеточные суспензии. Два миллиона клеток прививали в бок каждой мыши линии SCID. Затем животных случайным образом делили на 7 групп: 6 групп 191P4D12 для лечения антителами и группу с контрольным антителом P3-1.10.1.2 (n=10). Все антитела вводили внутрибрюшинно в дозе 750 мкг/животное два раза в неделю до конца исследования. Рост опухоли контролировали, проводя измерение опухолей с помощью штангенциркуля каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что 191P4D12 Mab незначительно ингибировало рост опухоли на модели ксенотрансплантатов рака легкого человека AG-L4 на мышах SCID. В дополнение к этому другие 191P4D12 MAbs были использованы в этом исследовании. Результаты не представлены. Фиг. 12.

Оценка Ha22-2(2,4)6.1 Mab на подкожной модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека HP AC на мышах SCID.

В другом эксперименте клетки рака поджелудочной железы человека HPAC (2,0 млн/мышь) вводили в бок отдельной мыши линии SCID. Затем животных случайным образом отнесли к восьми группам: 7 групп, обработанных антителом 191P4D12, и группа, обработанная контрольным антителом H3-1.4.1.2 (n=10). Все антитела вводили внутрибрюшинно в дозе 500 мкг/животное два раза в неделю до конца исследования. Рост опухоли контролировали, проводя измерение опухолей с помощью штангенциркуля

каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что 191P4D12 MAb не ингибировало рост опухоли на модели ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы человека на мышах SCID по сравнению с контрольным антителом. В дополнение к этому другие 191P4D12 MAbs были использованы в этом исследовании. Результаты не представлены. Фиг. 13.

Оценка Ha22-2(2,4)6.1 MAb на подкожной модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы AG-Panc3 на мышах SCID.

В другом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака поджелудочной железы AG-Panc3 поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Шесть кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Затем животных случайным образом делили на следующие группы ($n=10$): 2 группы, леченые 191P4D12 Mab, и группа, леченая контрольным антителом H3-1.4.1.2. Все антитела вводили внутривенно 500 мкг/животное два раза в неделю до конца исследования. Рост опухоли контролировали, проводя измерения опухолей с помощью штангенциркуля каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что 191P4D12 MAb не ингибировало рост ксенотрансплантата поджелудочной железы у мышей SCID по сравнению с контрольным антителом. Кроме того, в этом исследовании использовались другие 191P4D12 MAbs. Результаты не показаны. Фиг. 14.

Эффективность Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожной модели ксенотрансплантата рака легкого человека AG-L4 на мышах SCID.

В другом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака легкого AG-L13 поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Шесть кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Опухоли росли, не подвергаясь воздействию, до того, как они достигали приблизительного объема 200 мм^3 . Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE и контрольные ADC вводили в дозе 10 мг/кг каждые 7 дней в виде двух доз с помощью внутривенных болюсных инъекций. Количество введенного ADC соответствовало индивидуальному весу тела каждого животного, полученному непосредственно перед введением. Рост опухоли контролировали, проводя измерения штангенциркулем каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов AG-L4 рака легкого, подкожно привитых бестимусным мышам по сравнению с контрольным ADC. Кроме того, в этом исследовании использовались другие 191P4D12 MAbs. Результаты не показаны. Фиг. 15.

Эффективность Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожной модели ксенотрансплантата рака молочной железы BT-483 человека AG-L4 на мышах SCID.

В этом эксперименте клетки рака молочной железы человека BT-483 использовали для получения исходных ксенотрансплантатов, которые поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Шесть кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Опухоли росли, не подвергаясь воздействию, до того, как они достигали приблизительного объема 100 мм^3 . Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE и контрольный ADC вводили в дозе 5 мг/кг каждые 4 дня в виде 4 доз с помощью внутривенных болюсных инъекций. Количество введенного ADC соответствовало индивидуальному весу тела каждого животного, полученному непосредственно перед введением. Рост опухоли контролировали, проводя измерения штангенциркулем каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что лечение Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов BT-483 рака молочной железы, подкожно привитых мышам линии SCID, по сравнению с контрольным ADC. Кроме того, в этом исследовании использовались другие 191P4D12 MAbs. Результаты не показаны. Фиг. 16.

Эффективность Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожной модели ксенотрансплантата рака мочевого пузыря человека AG-B1 на мышах SCID.

В другом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака мочевого пузыря AG-B1 поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Шесть кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Опухоли росли, не подвергаясь воздействию, до того, как они достигали приблизительного объема 230 мм^3 . Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE и контрольный ADC вводили в дозе 4 мг/кг однократно с помощью внутривенной болюсной инъекции. Количество введенного ADC соответствовало индивидуальному весу тела каждого животного, полученному непосредственно перед введением. Рост опухоли контролировали, проводя

измерения штангенциркулем каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что лечение Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов AG-B1 рака мочевого пузыря по сравнению с контрольным ADC. Кроме того, другие 191P4D12 MAbs были использованы в этом исследовании. Результаты не показаны. Фиг. 17.

Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожной модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека AG-Panc2 на мышах SCID.

В другом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака поджелудочной железы AG-Panc2 поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Пять кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Опухоли росли, не подвергаясь воздействию, до того, как они достигали приблизительного объема 100 мм^3 . Na22-2(2,4)6.1vcMMAE и контрольный ADC вводили в дозе 5 мг/кг каждые 4 дня в виде 4 доз с помощью внутривенной болюсной инъекции. Количество введенного ADC соответствовало индивидуальному весу тела каждого животного, полученному непосредственно перед введением. Рост опухоли контролировали, проводя измерения штангенциркулем каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что лечение Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов AG-Panc2 рака поджелудочной железы по сравнению с контрольным ADC. Кроме того, в этом исследовании использовались другие 191P4D12 MAbs. Результаты не показаны. Фиг. 18.

Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожной модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека AG-Panc4 на мышах SCID.

В другом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака поджелудочной железы AG-Panc4 поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Шесть кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Na22-2(2,4)6.1vcMMAE и контрольный ADC вводили в дозе 5 мг/кг каждые 7 дней в виде трех доз с помощью внутривенной болюсной инъекции. Количество введенного ADC соответствовало индивидуальному весу тела каждого животного, полученному непосредственно перед введением. Рост опухоли контролировали, проводя измерения штангенциркулем каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что лечение Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE значительно ингибировало рост ксенотрансплантатов AG-Panc4 рака поджелудочной железы по сравнению с контрольным ADC. Кроме того, в этом исследовании использовались другие 191P4D12 MAbs. Результаты не показаны. Фиг. 19.

Сравнение эффективности дозировок Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожной модели ксенотрансплантата рака мочевого пузыря человека AG-B8 на мышах SCID.

В этом эксперименте полученные от пациента ксенотрансплантаты рака мочевого пузыря AG-B8 поддерживались серийными пассажами на мышах линии SCID. Исходные опухоли стерильно извлекали и резали на кусочки 1 мм^3 . Шесть кусочков были имплантированы в бок отдельной мыши линии SCID. Опухоли росли, не подвергаясь воздействию, до того, как они достигали приблизительного объема 200 мм^3 . Затем животных случайным образом делили на три следующие когорты ($n=6$): 2 группы, леченые Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE, и контрольную группу ADC VCD37-5ce5p-vcMMAE. Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE вводили в дозе 5 или 10 мг/кг , а контрольный ADC вводили в дозе 5 мг/кг . Все ADCs вводили однократно с помощью внутривенной болюсной инъекции. Количество введенного ADC соответствовало индивидуальному весу тела каждого животного, полученному непосредственно перед введением. Рост опухоли контролировали, проводя измерения штангенциркулем каждые 3-4 дня. Объем опухоли вычисляли как $\text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$, где ширина является самым маленьким размером, а длина является самым большим размером.

Результаты показывают, что лечение Na22-2(2,4)6.1vcMMAE в дозе 10 мг/кг ингибировало рост ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря xAG-B8 по сравнению с Na22-2(2,4)6.1vcMMAE в дозе 5 мг/кг . Фиг. 20.

Заключение.

В заключение, фиг. 12-20 показывают, что 191P4D12 ADC, названный Na22-2(2,4)6.1vcMMAE, значительно ингибировал рост опухолевых клеток, экспрессирующих 191P4D12, по сравнению с контрольными ADCs. Таким образом, Na22-2(2,4)6.1vcMMAE может использоваться для лечения и сдерживания развития злокачественных опухолей, представленных в табл. I.

Пример 8. Клинические испытания на людях лечения и диагностирования карцином человека с использованием 191P4D12 ADCs.

В соответствии с настоящим изобретением используются 191P4D12 ADCs, которые специфически связываются с 191P4D12 и находят применение при лечении определенных опухолей, предпочтительно перечисленных в табл. I. Применительно к каждому из этих указаний успешно рассматриваются два

клинических подхода.

I. Дополнительная терапия: при дополнительном лечении пациентов лечат 191P4D12 ADCs в комбинации с химиотерапевтическим или антинеопластическим средством и/или радиационной терапией или их комбинацией. Первичные злокачественные опухоли-мишени, такие как перечисленные в табл. I, лечат в соответствии со стандартными протоколами, добавляя 191P4D12 ADCs к стандартному лечению первой или второй линии. Протокол предполагает адресную эффективность, которая оценивается, например, включая, но не ограничиваясь этим, по уменьшению опухолевой массы первичных или метастатических очагов поражения, увеличению выживаемости без прогрессирования, увеличению общей выживаемости, улучшению здоровья пациентов, стабилизации болезни, а также возможности уменьшать обычные дозы стандартной химиотерапии и других биологических средств. Такое уменьшение дозировки дает возможность проведения дополнительного и/или продолжительного лечения, уменьшив связанную с дозировкой токсичность химиотерапевтического или биологического средства. 191P4D12 ADCs используются в некоторых дополнительных клинических испытаниях в комбинации с химиотерапевтическими или антинеопластическими средствами.

II. Монотерапия: при использовании в монотерапии опухолей 191P4D12 ADCs вводятся пациентам без химиотерапевтического или антинеопластического средства. В одном варианте осуществления монотерапия проводится пациентам со злокачественным новообразованием в конечной стадии заболевания с распространенной метастатической болезнью. Протокол предполагает адресную эффективность, которая оценивается, например, включая, но не ограничиваясь этим, по уменьшению опухолевой массы первичного или метастатического поражений, увеличению выживаемости без прогрессирования, увеличению общей выживаемости, улучшению здоровья пациентов, стабилизации болезни, а также возможности уменьшать обычные дозы стандартной химиотерапии и других биологических средств.

Дозировка.

Чтобы обеспечить оптимальный желательный ответ, можно регулировать режимы дозирования. Например, можно вводить отдельную болюсную инъекцию, можно вводить несколько дробных доз в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить, на что указывает необходимость терапевтической ситуации. Особенно удобно заключать парентеральные композиции в стандартную лекарственную форму для удобства введения и однородности дозировки. Стандартная лекарственная форма при использовании в описании относится к физически отдельным единицам, пригодным в качестве единичных дозировок для субъектов-млекопитающих, которых необходимо лечить; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желательного терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Характеристики стандартных лекарственных форм изобретения обуславливаются и прямо зависят от (а) уникальных характеристик антитела и/или ADC и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, который нужно получить, и (б) ограничений, характерных в данной области техники, для пригодования такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Иллюстративный, неограничивающий предел терапевтически эффективного количества 191P4D12 ADC, введенного в комбинации согласно изобретению, составляет примерно от 0,5 до 10 мг/кг, примерно от 1 до 5 мг/кг, по меньшей мере 1 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг, по меньшей мере 3 мг/кг или по меньшей мере 4 мг/кг. Другие иллюстративные, неограничивающие пределы составляют, например, примерно от 0,5 до 5 мг/кг, или, например, примерно от 0,8 до 5 мг/кг, или, например, примерно от 1 до 7,5 мг/кг. Вариант осуществления высокой дозы изобретения имеет отношение к дозировке более чем 10 мг/кг. Следует отметить, что величина дозировки может меняться в зависимости от типа и тяжести состояния, которое нужно улучшить, и может включать одну или множество доз. Кроме того, следует понимать, что для любого отдельного субъекта конкретные режимы дозирования в течение времени следует корректировать в соответствии с индивидуальной необходимостью и профессиональным суждением лица, осуществляющего лечение или контролирующего введение композиций, и что диапазон доз, излагаемый в этом документе, является только иллюстративным и не предназначается для ограничения рамок или осуществления на практике заявленной композиции.

План клинических исследований (CDP)

CDP контролирует и совершенствует методы лечения 191P4D12 ADCs применительно к дополнительной терапии или монотерапии. Испытания сначала продемонстрировали безопасность, а после этого подтвердили эффективность повторных доз. Испытания представляют собой открытые клинические исследования (без контроля плацебо), сравнивающие стандартную химиотерапию со стандартной химиотерапией в сочетании с 191P4D12 ADCs. Следует понимать, что одним неограниченным критерием, который может использоваться в связи с зачислением пациентов, является уровень экспрессии 191P4D12 в опухолях, определенный с помощью биопсии.

Как и в случае с любым белком или лечением с использованием вливания антител, проблемы безопасности связаны в первую очередь с (i) синдромом высвобождения цитокинов, т.е. гипотонией, жаром, лихорадкой, ознобом; (ii) развитием иммунного ответа на материал (т.е. выработкой человеческих антител у пациента на терапевтические антитела, или НАМА ответ) и (iii) токсичностью по отношению к нормальным клеткам, экспрессирующим 191P4D12. Для контроля каждой из этих угроз безопас-

ности используются стандартные тесты и наблюдение. Обнаружено, что 191P4D12 ADCs являются безопасными при введении человеку.

Пример 9. Обнаружение белка 191P4D12 в образцах пациентов со злокачественным новообразованием с помощью ИНС.

Экспрессию белка 191P4D12 исследовали иммуногистохимическим методом анализа в образцах пациентов с раком (i) мочевого пузыря, (ii) молочной железы, (iii) поджелудочной железы, (iv) легкого, (v) яичника, (vi) пищевода и (vii) головы и шеи. Коротко, из зафиксированных в формалине, залитых парафином тканей готовили срезы толщиной 4 мкм и помещали на предметные стекла. Удаляли воск со срезов, регидратировали и обрабатывали раствором EDTA для демаскирования антигена (Biogenex, San Ramon, CA) в микроволновом EZ-Retriever (Biogenex, San Ramon, CA) в течение 30 мин при 95°C. Затем срезы обрабатывали раствором 3% перекиси водорода, чтобы инактивировать активность эндогенной пероксидазы. Бессывороточный блокирующий агент Protein Block (Dako, Carpinteria, CA) использовали, чтобы ингибировать неспецифическое связывание до инкубации с моноклональными мышиными анти-191P4D12 антителами или изотипическим контролем. Затем срезы обрабатывали с использованием системы Super Sensitive™ Polymer-horseradish peroxidase (HRP) Detection System, которая включает инкубацию в реагенте Super Enhancer™ с последующей инкубацией с конъюгатом полимерной HRP с вторичным антителом (BioGenex, San Ramon, CA). Затем срезы обработали с использованием набора DAB (BioGenex, San Ramon, CA). Ядра окрашивали гематоксилином и анализировали с помощью светлопольной микроскопии. Специфическое окрашивание было обнаружено в образцах пациентов с помощью 191P4D12 иммунореактивного антитела, на что указывает бурое окрашивание. (см. фиг. 21(A), 21(C), 21(E), 21(G), 21(I), 21(K) и 21(M)). В противоположность этому, контрольное антитело не окрашивало какие-либо образцы, полученные от пациента. (см. фиг. 21(B), 21(D), 21(F), 21(H), 21(J), 21(L) и 21(N)).

Результаты указывают на экспрессию 191P4D12 в опухолевых клетках из злокачественных тканей мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника, легкого, пищевода, головы и шеи пациента. Эти результаты показывают, что 191P4D12 экспрессируется в злокачественных опухолях человека и что антитела к этому антигену и конъюгат антитело-лекарственное средство, обозначенный Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE), являются пригодными для применения в диагностических и терапевтических целях. Фиг. 21.

Пример 10. Определение эпитопа связывания Ha22-2(2,4)6.1 Mab.

Белок 191P4D12 человеческого, обезьян циномогус, крысиного и мышиного происхождения был рекомбинантно экспрессирован в линии клеток PC3, чтобы определить перекрестную реактивность Ha22-2(2,4)6.1 к этим ортологам. Было показано, что Ha22-2(2,4)6.1 обладает значительной перекрестной реактивностью с ортологами циномогус и крыс 191P4D12 (фиг. 23). Значения связывания EC₅₀ показаны в табл. VII. Связывание Ha22-2(2,4)6.1 с мышинным ортологом показывает значительное уменьшение величины связывания EC₅₀, что показывает важные аминокислотные замены в V домене (по сравнению с последовательностями человека и крысы), затрагивающие аффинность Ha22-2(2,4)6.1 к 191P4D12.

Табл. VIII показывает выравнивание aa 1-180 белковой последовательности 191P4D12 ортологов, содержащих V-домен. Только две аминокислоты в последовательности ортолога крысы, Thr-75 и Ser-90, замещаются в последовательности ортолога мыши на Ile и Asn соответственно (выделенные жирным шрифтом). Следует отметить, что соответствующими аминокислотами в человеческой последовательности являются Ala-76 и Ser-91. Чтобы определить, содержит ли эти аминокислоты эпитоп связывания Ha22-2(2,4)6.1, были созданы несколько мутантных конструкторов 191P4D12 и его мышинный ортолог и экспрессированы в клетках PC3 (табл. IX). "Мышиные" аминокислоты были введены вместо стандартного мутагенеза в виде замены аланина в человеческую последовательность и наоборот в мышиную последовательность.

Было показано, что мутация Ser-91 на Asn в 191P4D12 сильно ухудшает связывание Ha22-2(2,4)6.1, подтверждая, что эта аминокислота, Ser-91, является существенной для связывания и должна содержать эпитоп, узнаваемый Ha22-2(2,4)6.1 MAb. Дополнительная мутация Ala в положении 76 (A76I, S91N двойной мутант) также была введена в 191P4D12. Было показано, что связывание Ha22-2(2,4)6.1 с двойным мутантом A76I, S91N является похожим на связывание с ортологом мыши (фиг. 24). С другой стороны, мутация Asn-90 в мышинной последовательности на Ser сильно улучшает связывание Ha22-2(2,4)6.1 с мутантным ортологом мыши, дополнительно подтверждая важность аминокислоты в этом положении для связывания Ha22-2(2,4)6.1. Связывание Ha22-2(2,4)6.1 с двойным мутантом ортолога мыши A90S, I75A, по-видимому, очень сходно с человеческим ортологом 191P4D12.

Взятые в совокупности, эти данные подтверждают, что Ser-91 и Ala-76 играют решающую роль в связывании Ha22-2(2,4)6.1 с белком 191P4D12 на поверхности клетки и составляют часть эпитопа, распознаваемого Ha22-2(2,4)6.1, на поверхности 191P4D12.

Чтобы визуализировать эту идею, мы создали компьютерную модель V-домена 191P4D12, исходя из опубликованных данных о кристаллической структуре членов семейства 191P4D12 и белков, содержащих Ig-домен, с помощью PyMOL (фиг. 25). Показаны положения Ala-76 (испещренные точками) и Ser-91 (заштрихованный).

В дополнение к этому, чтобы дополнительно усовершенствовать сайт связывания Ha22-2(2,4)6.1 на молекуле 191P4D12, мы создали и получили экспрессию фрагмента 191P4D12, соответствующего V-домену на поверхности клеток Rat(1)E. Следующий конструктор был получен в ретровирусном векторе: 191P4D12 (aa1-150,347-510).

Связывание Ha22-2(2,4)6.1 MAb оценивали с помощью FACS. Как показано на фиг. 26, Ha22-2(2,4)6.1 связывается с клетками, экспрессирующими V-домен (A), а также диким типом 191P4D12 (B), но не с клетками, экспрессирующими C1C2 домен, полученными ранее (C). Это свидетельствует о том, что сайт связывания этого антитела располагается в V-доме 191P4D12 в пределах первых 150 аминокислот.

Результаты показывают, что Ha22-2(2,4)6.1 MAb связывается с v-доме 191P4D12 по положению aa 1-150, и дополнительно показывают, что специфический эпитоп, содержащий aa Ser-91 и aa Ala-76, является решающим для связывания Ha22-2(2,4)6.1 MAb.

На всем протяжении этой заявки приводятся ссылки на содержание данных различных веб-сайтов, публикации, патентные заявки и патенты. (Ссылки на веб-сайты приводятся с помощью унифицированного указателя ресурсов, или URL, адреса во всемирной компьютерной сети.) Раскрытие каждой из этих ссылок полностью включается в описание путем отсылки.

Настоящее изобретение не ограничивается в объеме раскрытыми в описании вариантами осуществления, которые предназначаются только для иллюстрации отдельных аспектов изобретения, и любые аспекты, являющиеся функционально эквивалентными, находятся в объеме изобретения. Различные модификации моделей и способов изобретения, в дополнение к раскрытым в описании, станут понятны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и идей и аналогичным образом подпадают под действие изобретения. Такие модификации или другие варианты осуществления могут применяться без отклонения от истинного объема и сущности изобретения.

Таблицы

Таблица I. Ткани, экспрессирующие 191P4D12 при озлокачествлении.

Поджелудочная железа

Яичник

Молочная железа

Легкие

Мочевой пузырь

Таблица II. Сокращенные названия аминокислот

Однбуквенное	Трехбуквенное	Полное название
F	Phe	фенилаланин
L	Leu	Лейцин
S	Ser	Серин
Y	Tyr	Тирозин
C	Cys	Цистеин
W	Trp	Триптофан
P	Pro	Пролин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
R	Arg	Аргинин
I	Ile	Изолейцин
M	Met	Метионин
T	Thr	Треонин
N	Asn	Аспарагин
K	Lys	Лизин
V	Val	Валин
A	Ala	Аланин
D	Asp	аспарагиновая кислота
E	Glu	глутаминовая кислота
G	Gly	Глицин

Таблица III. Матрица аминокислотных замен.

Основанная на GCG программном обеспечении 9.0 BLOSUM62 матрица аминокислотных замен (подстановочная матрица). Чем выше значение, тем более вероятная замена обнаруживается в родственных природных белках.

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	-2	C
6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	-3	-3	D
5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	-2	-2	-2	E
6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	3	3	3	3	F
6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	-3	-3	G
8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	-3	-2	2	2	2	2	2	H
4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I						I
5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K								K
4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L									L
5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M										M
6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N											N
7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P												P
5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q													Q
5	-1	-1	-3	-3	-2	R														R
4	1	-2	-3	-2	S															S
5	0	-2	-2	T																T
4	-3	-1	V																	V
11	2	W																		W
7	Y																			Y

Таблица IV. Общий метод синтеза vcMMAE.

Где AA1 = аминокислота 1;

AA2 = аминокислота 2;

AA5 = аминокислота 5;

DIL = долаизолейцин;

DAP = долапролин.

Линкер = Val-Cit (vc).

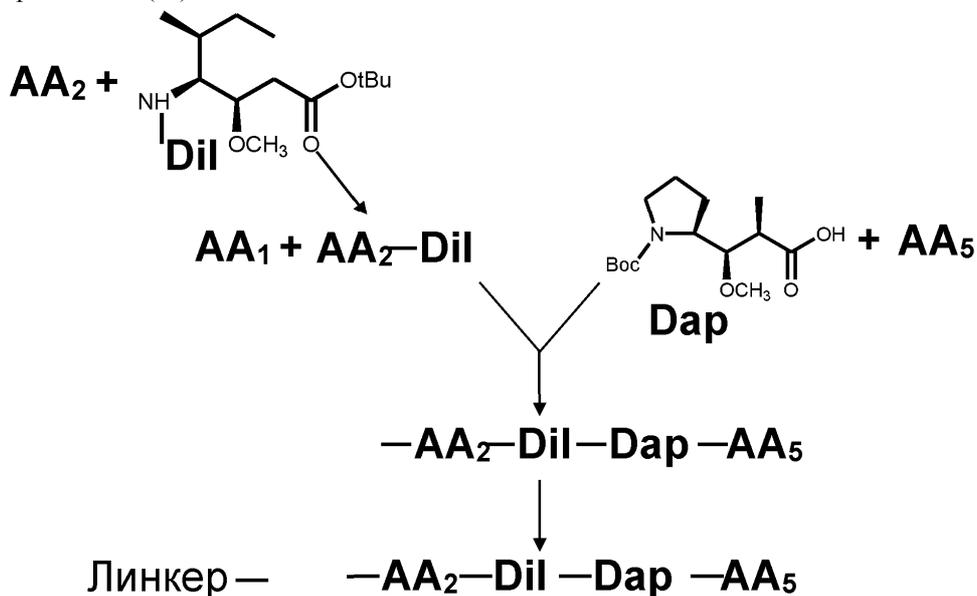


Таблица V. Вычисление скорости ассоциации и диссоциации и полученная аффинность с использованием Biacore

	kon, M-1s-1	koff, s-1	KD, M
Ha22-2(2,4)6.1	3.8E+05	5.8E-03	1.6E-08
Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE	4.5E+05	5.2E-03	1.1E-08

Таблица VI. 191P4D12 конструкторы, использованные в картировании домена. Названия конструкторов
 191P4D12 (aa 1-242, 347-510) VC1, Rat1(E) экспрессирующая линия
 191P4D12 (aa 1-31, 147-510) C1C2, Rat1(E) экспрессирующая линия
 191P4D12 (aa 1-242) mFc-VC1, гибридный белок
 191P4D12 (aa 1-31, 147-346) mFc-C1C2, гибридный белок
 191P4D12 (aa 1-141) mFc-V, гибридный белок

Таблица VII

	PC3-191P4D12	Ортолог циномоглус	Ортолог крысы	Ортолог мыши
Vmax (MFI)	816	1146	679	325
EC₅₀ (нМ)	0.28	0.30	0.44	70.3

Таблица VIII. (SEQ ID NOS: 11-13, по порядку)

Мышь	MPLSLGAEMWGPPEAWLR-LLFLASFTGQYSAGELETSDVVTVVVLGQDAKLPFCFYRGDPDE	59
Крыса	MPLSLGAEMWGPPEAWLL-LLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVVLGQDAKLPFCFYRGDPDE	59
человек	MPLSLGAEMWGPPEAWLLLLLLLLLASFTGRCPAGELETSDVVTVVVLGQDAKLPFCFYRGDSGE	60
	***** **:******: .*****:*****.*	
Мышь	QVGQVAWARVDPNEGIRELALLHSHKYGLHVNPAVEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQA	119
Крыса	QVGQVAWARVDPNEGTRRELALLHSHKYGLHVS PAVEDRVEQPPPPRDPLDGSILLRNAVQA	119
человек	QVGQVAWARVDAGEGAQELALLHSHKYGLHVS PAVEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQA	120
	***** .** :*****.****.*****:*****:*****	
Мышь	DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPLPSLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS	179
Крыса	DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLVPLPSLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS	179
человек	DEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPLPSLNPGPPEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS	180
	*****:*****.*****:*****	

Таблица IX

Конструкторы дикого типа	Мутантные конструкторы	Двойные мутантные конструкторы
191P4D12, дикий тип	S91N	S91N, A76I
Ортолог мыши 191P4D12, дикий тип	N90S	N90S, I75A

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий анти-191P4D12 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с монометилаурисатином E (MMAE), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 45 до 52 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 70 до 77 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 116 до 125 остатка в SEQ ID NO: 7, CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 49 до 54 остатка в SEQ ID NO: 8, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 72 до 74 остатка в SEQ ID NO: 8, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность, простирающуюся от 111 до 119 остатка в SEQ ID NO: 8.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антигенсвязывающий фрагмент представ-

ляет собой Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело является полностью человеческим антителом.

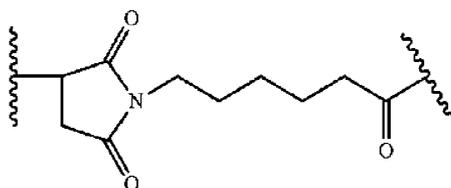
4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получены рекомбинантным способом.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с ММАЕ через линкер.

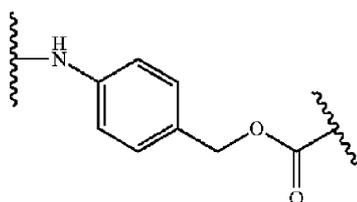
6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.5, где линкер содержит валин-цитруллин.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.5, где линкер представлен линкером, расщепляемым ферментами, и где линкер образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.5, где линкер имеет формулу -A_a-W_w-Y_y-; где -A- представляет собой звено расширителя, а является 0 или 1; -W- является аминокислотным звеном, w является целым числом в диапазоне от 0 до 12; и -Y- является спейсерным звеном, у является 0, 1 или 2; где звено расширителя имеет структуру формулы (1) ниже; аминокислотное звено является валин-цитруллином; и звено спейсера является группой РАВ, имеющей структуру формулы (2) ниже;



Формула (1)



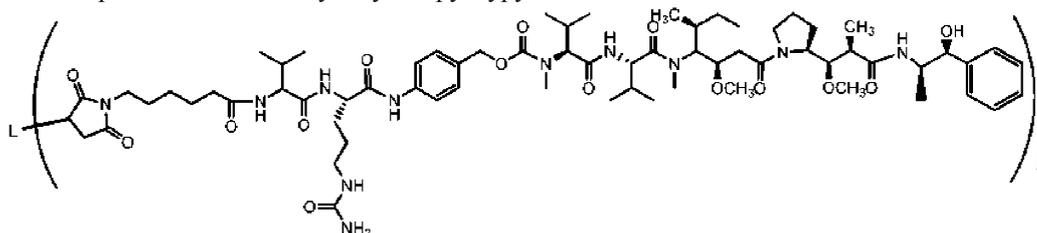
Формула (2);

где звено расширителя образует связь между атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и где спейсерное звено связано с ММАЕ посредством карбаматной группы.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-8, содержащий от 2 до 9 единиц ММАЕ на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-9, содержащий от примерно 2 до примерно 8 единиц ММАЕ на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-10, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



где L- представляет собой анти-191P4D2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и p находится в диапазоне от 2 до 6.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.11, где p находится в диапазоне от 3 до 5.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство для лечения рака, который экспрессирует белок 191P4D12, содержащий анти-191P4D12 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с 1-20 единицами монометиладельтата Е (ММАЕ), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариabельную область тяжелой цепи, содержащую гипервариabельные участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариabельной области тяжелой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, задепонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером РТА-11267, и вариabельную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из вариabельной области легкой цепи антитела, продуцируемого гибридомой, задепонированной в АТСС под номером РТА-11267, где CDR определяют согласно схеме нумерации IMGT.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.13, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.13, где антитело является полностью человеческим антителом.

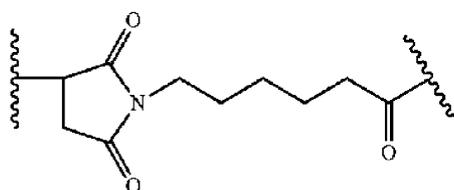
16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получены рекомбинантным способом.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с MMAE через линкер.

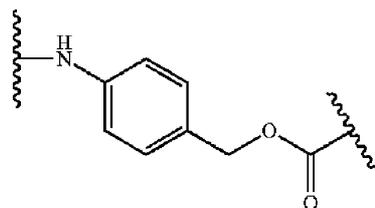
18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.17, где линкер содержит валин-цитруллин.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.17, где линкер представлен линкером, расщепляемым ферментами, и где линкер образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.17, где линкер имеет формулу -A_w-W_w-Y_y-; где -A- представляет собой звено расширителя, а является 0 или 1; -W- является аминокислотным звеном, w является целым числом в диапазоне от 0 до 12; и -Y- является спейсерным звеном, y является 0, 1, или 2; где звено расширителя имеет структуру формулы (1) ниже; аминокислотное звено является валин-цитруллином; и звено спейсера является группой PAB, имеющей структуру формулы (2) ниже;



Формула (1)



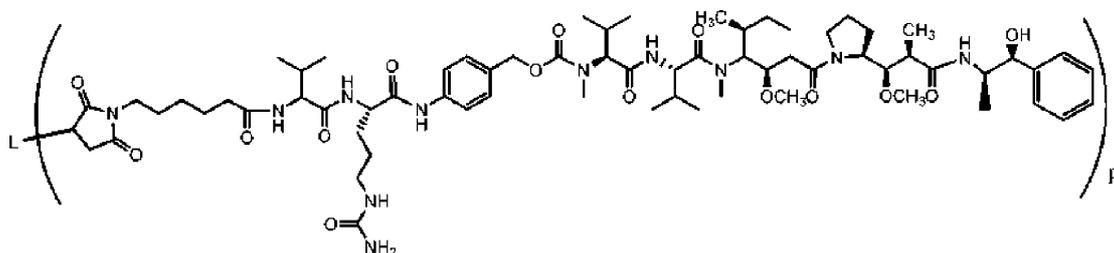
Формула (2);

где звено расширителя образует связь между атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и где спейсерное звено связано с MMAE посредством карбаматной группы.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-20, содержащий от 2 до 10 единиц MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-21, содержащий от 2 до 6 единиц MMAE на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-22, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



где L- представляет собой анти-191P4D2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и p находится в диапазоне от 1 до 5.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.23, где p около 4.

25. Фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, где рак экспрессирует белок 191P4D12, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, где субъект является человеком.

27. Фармацевтическая композиция по п.25 или 26, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря или рак молочной железы.

28. Фармацевтическая композиция по любому из пп.25-27, где рак представляет собой рак мочевого пузыря.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, где рак представляет собой прогрессирующий рак моче-

вого пузыря.

30. Фармацевтическая композиция по п.28, где рак представляет собой метастатический рак мочевого пузыря.

31. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-24 для лечения рака, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря или рак молочной железы, где рак экспрессирует белок 191P4D12.

32. Применение по п.31, где лечение рака предусматривает сочетание конъюгата антитело-лекарственное средство с облучением или сочетание конъюгата антитело-лекарственное средство с химиотерапевтическим средством.

33. Применение по п.31 или 32, где рак представляет собой рак мочевого пузыря.

34. Применение по п.33, где рак представляет собой прогрессирующий рак мочевого пузыря.

35. Применение по п.33, где рак представляет собой метастатический рак мочевого пузыря.

36. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение данному субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-24, где рак экспрессирует белок 191P4D12.

37. Способ по п.36, где субъект является человеком.

38. Способ по п.36 или 37, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак легкого, рак мочевого пузыря или рак молочной железы.

39. Способ по п.38, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

40. Способ по п.38, где рак представляет собой рак легкого.

41. Способ по п.38, где рак представляет собой рак мочевого пузыря.

42. Способ по п.41, где рак представляет собой прогрессирующий рак мочевого пузыря.

43. Способ по п.41, где рак представляет собой метастатический рак мочевого пузыря.

44. Способ по п.38, где рак представляет собой рак молочной железы.

45. Способ по п.38, предусматривающий введение от 0.5 до 10 мг/кг конъюгата антитело-лекарственное средство человеку.

46. Способ по любому из пп.36-45, включающий введение конъюгата антитело-лекарственное средство в сочетании с облучением или химиотерапевтическим средством.

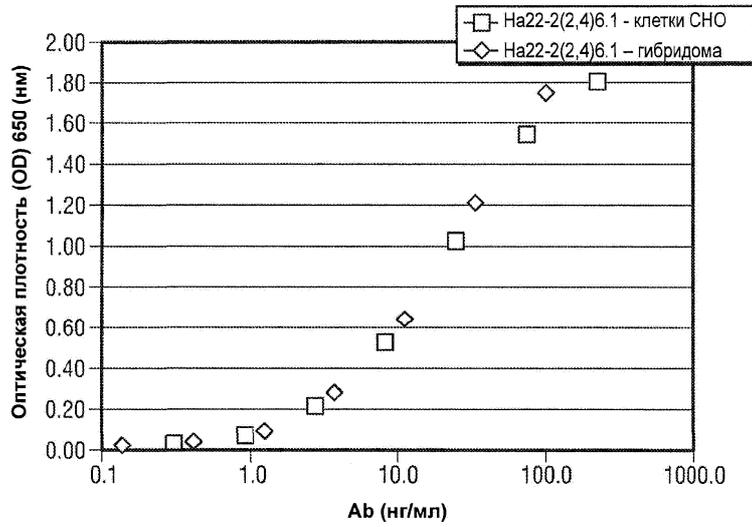
кДНК (SEQ ID NO:1) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:2) 191P4D12. Начальный метионин подчеркнут. Открытая рамка считывания простирается от нуклеиновой кислоты 264 до 1796, включая стоп-кодон.

```

1  ggcgcgtcgttgttggccacagcgtgggaagcagctctggtgggagctcggagctcccgatc
61  acggcttcttggggtagctacggctgggtgtgtagaacggggccgggctggggctggg
121  tccccctagtgagacccaagtgcgagaggcaagaactctgcagcttccctgcttctgggt
181  cagttcccttattcaagctctgcagccggctcccagggagatctcggtggaacttcagaaac
1      M P L S L G A E M W G P E
241  gctgggcagctctgcctttcaaccATGCCCCGTCCCTGGGAGCCGAGATGTGGGGGCTG
14   A W L L L L L L L A S F T G R C P A G E
301  AGGCCTGGCTGCTGCTGCTACTGCTGGCATCATTTACAGGCCGGTGCCCCGGGGTG
34   L E T S D V V T V V L G Q D A K L P C F
361  AGCTGGAGACCTCAGACGTGGTAACTGTGGTCTGGGCCAGGACGCAAACTGCCCTGCT
54   Y R G D S G E Q V G Q V A W A R V D A G
421  TCTACCGAGGGGACTCCCGCGAGCAASTGGGGCAAGTGGCATGGGCTCCGGTGGACGCGG
74   E G A Q E L A L L H S K Y G L H V S P A
481  GCGAAGGCGCCAGGAAGTACGCGTACTGCACTCCAAATACGGGCTTCATGTGAGCCCGG
94   Y E G R V E Q P P P P R N P L D G S V L
541  CTTACGAGGGCCCGGTGGAGCAGCCGCGCCCCCAAGCAACCCCTGGACGGCTCAGTGC
114  L R N A V Q A D E G E Y E C R V S T F P
601  TCCTGCGCAACCGAGTGCAGGCGGATGAGGGGAGTACGAGTGGCCGGGTGAGCACCTCC
134  A G S F Q A R L R L R V L V P P L P S L
661  CGCGCGCAGCTCCAGCCGCGGCTGCGGCTCCGAGTGTGGTCCCTCCCTGCCCTCAC
154  N P G P A L E E G Q G L T L A A S C T A
721  TGAATCCTGGTCCAGCACTAGAAGAGGGCCAGGGCCTGACCCCTGGCAGCCTCCCTGCACG
174  E G S P A P S V T W D T E V K G T T S S
781  CTGAGGCGAGCCAGCCCCAGCGTACCTGGGACACGGAGGTCAAAGGCACAACGTCCA
194  R S F K H S R S A A V T S E F H L V P S
841  GCCGTTCCTTCAAGCACTCCCGCTCTGCTGCCGTACCTCAGAGTCCACTGGTGCCTA
214  R S M N G Q P L T C V V S H P G L L Q D
901  GCCGCAGCATGAATGGGCAGCCACTGACTTGTGTGGTGTCCCATCCCTGGCCTGCTCCAGG
234  Q R I T H I L H V S F L A E A S V R G L
961  ACCAAAGGATCACCCACATCCTCCACGTGCTCCTTCCCTGCTGAGGCCTCTGTFGAGGGCC
254  E D Q N L W H I G R E G A M L K C L S E
1021 TTGAAGACCCAAATCTGTGGCACATTGGCAGAGAAGGAGCTATGCTCAAGTGCCTGAGTG
274  G Q P P P S Y N W T R L D G P L P S G V
1081 AAGGGCAGCCCCCTCCCTCAATACAACCTGGACACGGCTGGATGGGCCTCTGCCAGTGGGG
294  R V D G D T L G F P P L T T E H S G I Y
1141 TACGAGTGGATGGGGACACTTTGGGCTTTCCCCACTGACCACTGAGCACAGGGCATCT
314  V C H V S N E F S S R D S Q V T V D V L
1201 ACGTCTGCCATGTCAGCAATGAGTCTCCTCAAGGGATTCACAGSTCACTGTGGATGTTT
334  D P Q E D S G K Q V D L V S A S V V V V

```

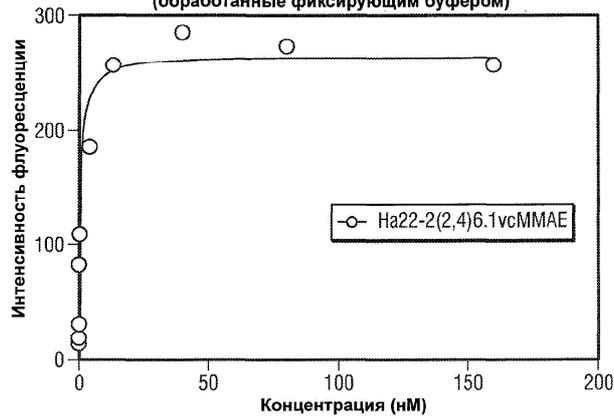

Связывание Ha22-2(2,4)6.1 Mab, показанное методом ELISA



Фиг. 5B

Определение аффинности Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с помощью FACS
с использованием РС3-человек-191P4D12 клеток
РС3-человек-191P4D12 клетки
(обработанные фиксирующим буфером)

Величина интенсивности флуоресценции (MFI) (нм)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE Lot vcE-03
160	257
80	273
40	285
13.33	256
4.44	183
1.48	183
0.49	105
0.16	78
0.05	26
0.02	14
0.01	9
0.000	1

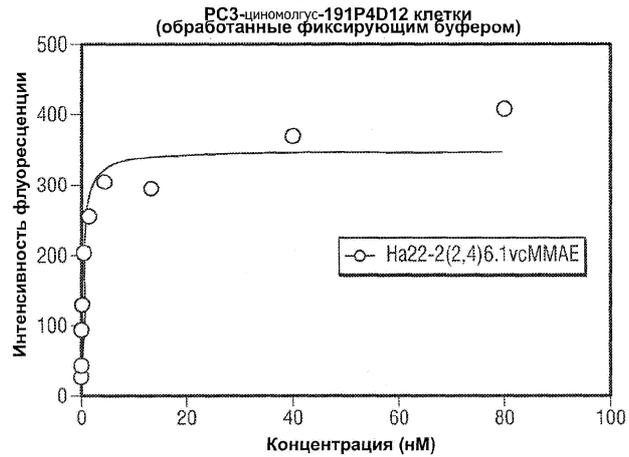


	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE Lot vcE-03
Вmax	265
Кд (константа диссоциации) (нМ)	0.69

Фиг. 6

Определение аффинности Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с помощью FACS
с использованием РС3-циномолгус-191P4D12 клеток

Величина интенсивности флуоресценции (MFI) (нм)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE Lot vcE-03
160	375
80	403
40	364
13.33	288
4.44	298
1.48	248
0.49	196
0.16	122
0.05	86
0.02	34
0.01	19
0.000	1

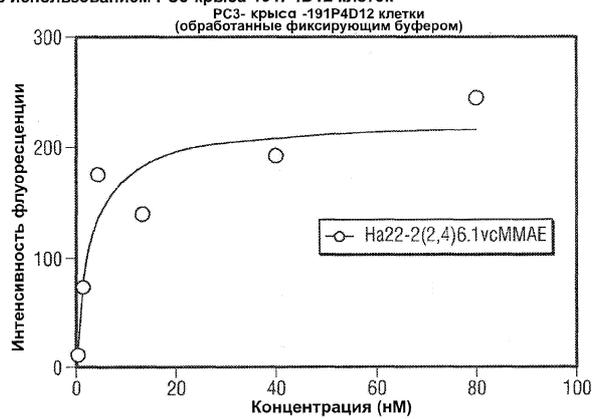


	Ha22- 2(2,4)6.1vcMMAE Lot vcE-03
Вmax	343
Кд (константа диссоциации) (нМ)	0.34

Фиг. 7

Определение аффинности Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE с помощью FACS
с использованием РС3-крыса-191P4D12 клеток

Величина интенсивности флуоресценции (MFI) (нм)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE Lot vcE-03
160	205
80	296
40	243
13.33	192
4.44	224
1.48	121
0.49	56
0.16	40
0.05	22
0.02	11
0.01	8
0.000	4

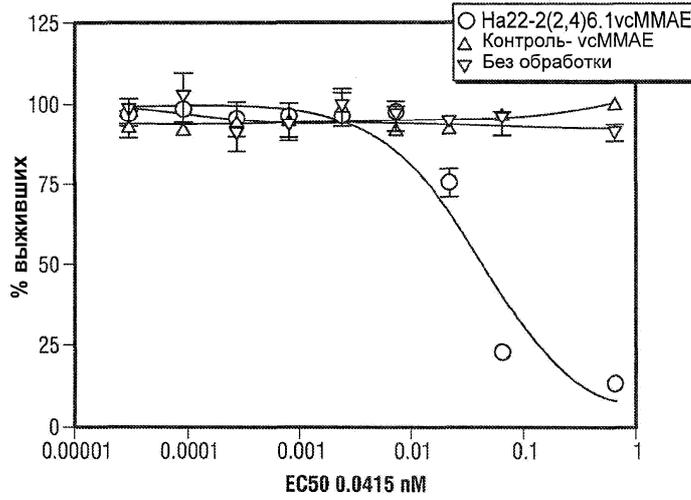


	Ha22- 2(2,4)6.1vcMMAE Lot vcE-03
Вmax	265
Кд (константа диссоциации) (нМ)	1.6

Фиг. 8

Клеточная цитотоксичность, опосредованная Na22-2(2,4)6.1vcMMAE.

PC3-человек-191P4D12: 4 день уничтожено/ 1500 клеток на лунку



Фиг. 9А

PC3-циномолгус-191P4D12: 4 день уничтожено/ 1500 клеток на лунку

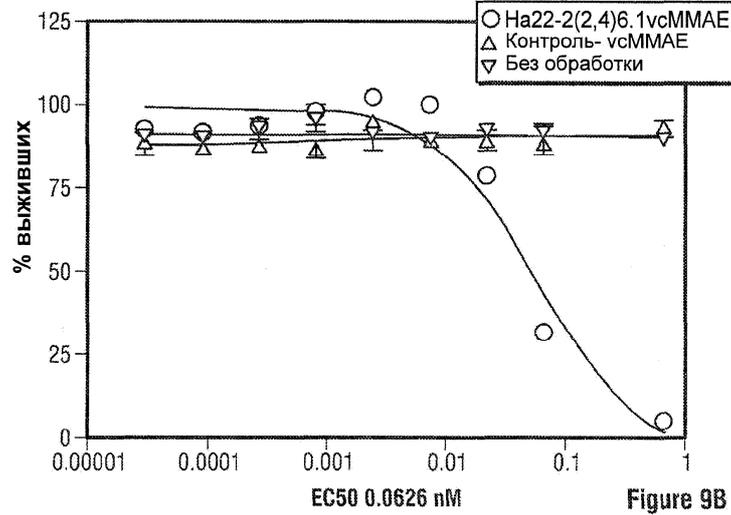
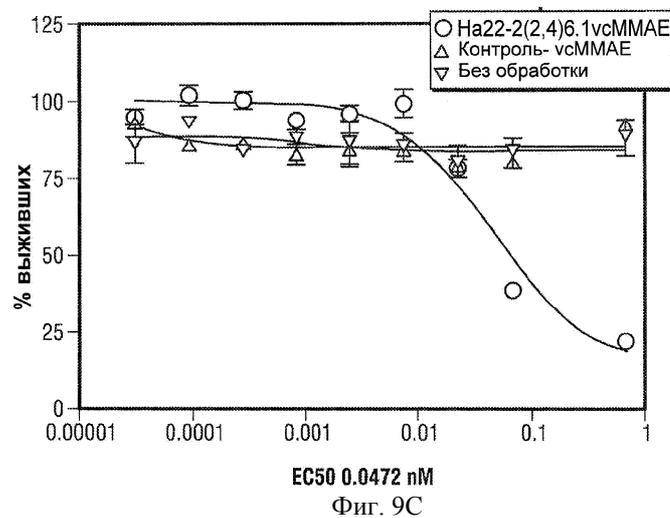


Figure 9B

Фиг. 9В

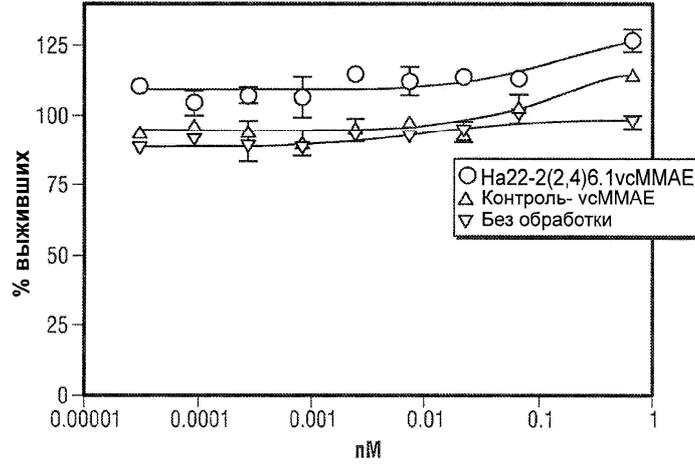
Клеточная цитотоксичность, опосредованная Na22-2(2,4)6.1vcMMAE.

PC3-крыса-191P4D12: 4 день уничтожено/ 1500 клеток на лунку



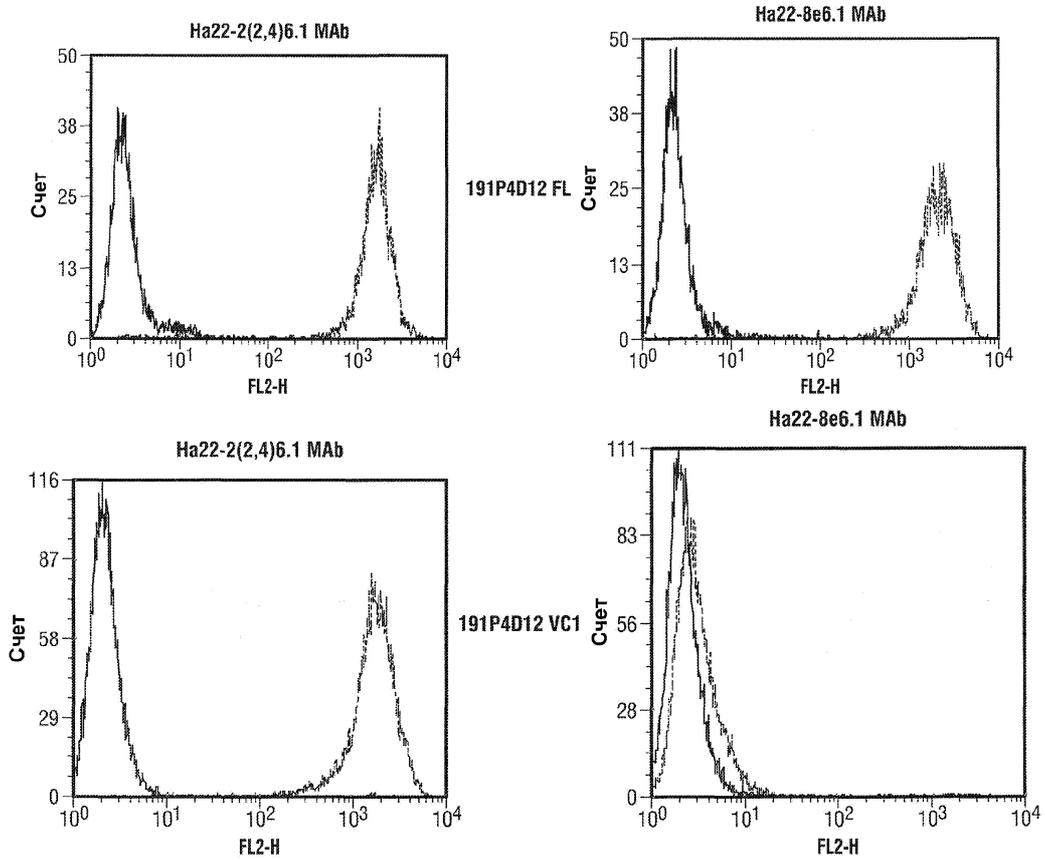
Фиг. 9С

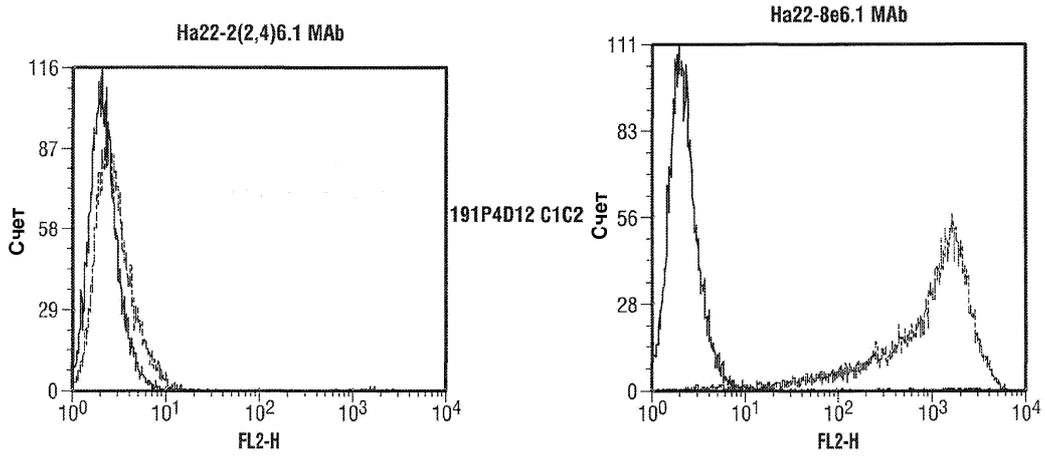
РС-3-Нео: 4 день уничтожено / 1500 клеток на лунку $pM=nM$



Фиг. 9D

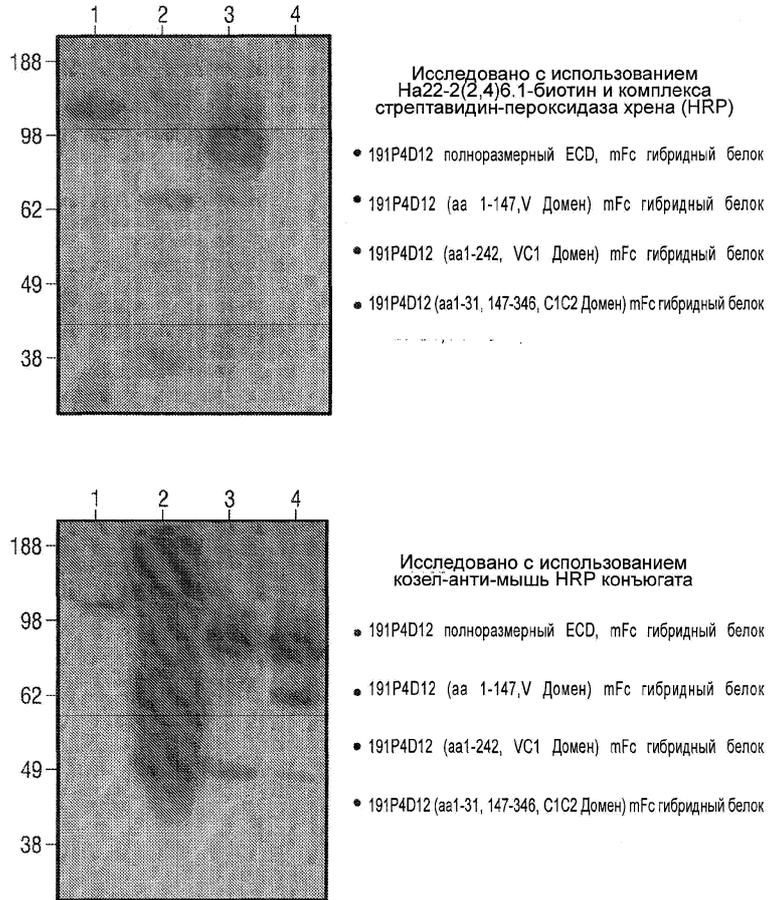
Картирование домена Ha22-(2,4)6.1 MAb с помощью FACS.





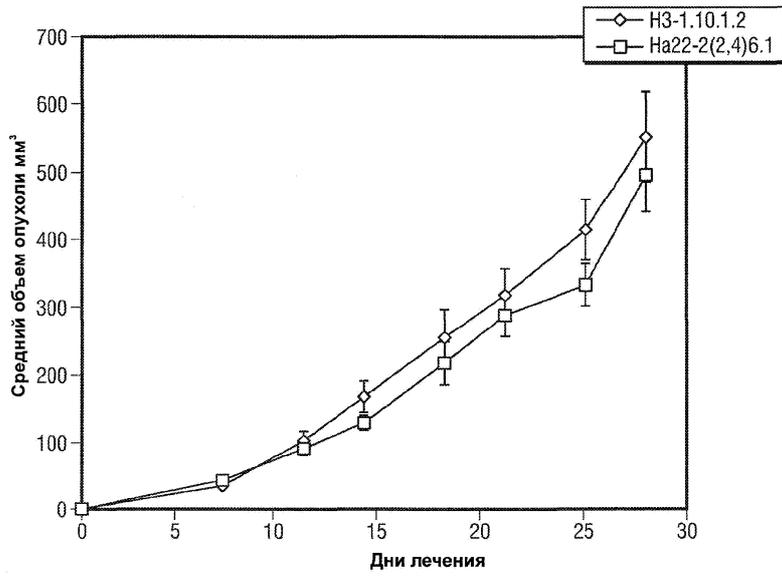
Фиг. 10

Картирование домена Ha22-2(2,4)6.1 MAb с помощью Вестерн-блоттинга.



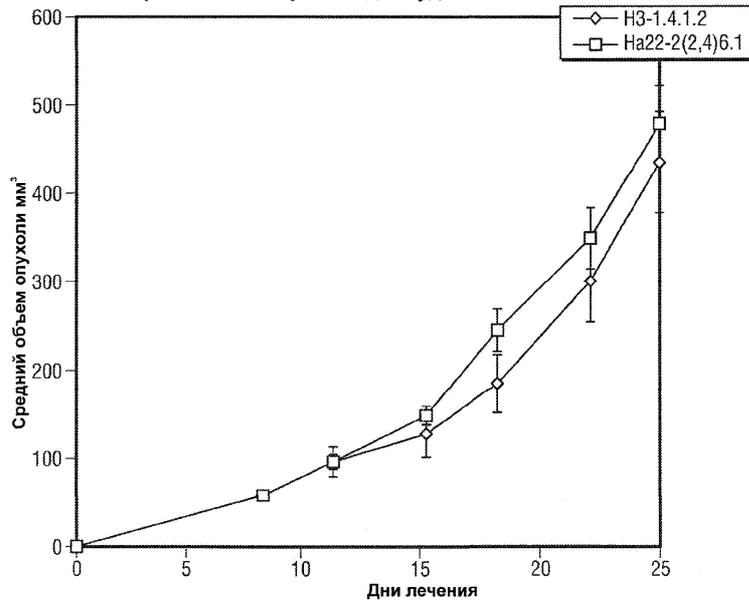
Фиг. 11

Оценка Ha22-2(2,4)6.1 МАв на подкожной модели формирования опухоли с использованием ксенотрансплантата рака легкого человека AG-L4 на мышах линии SCID.



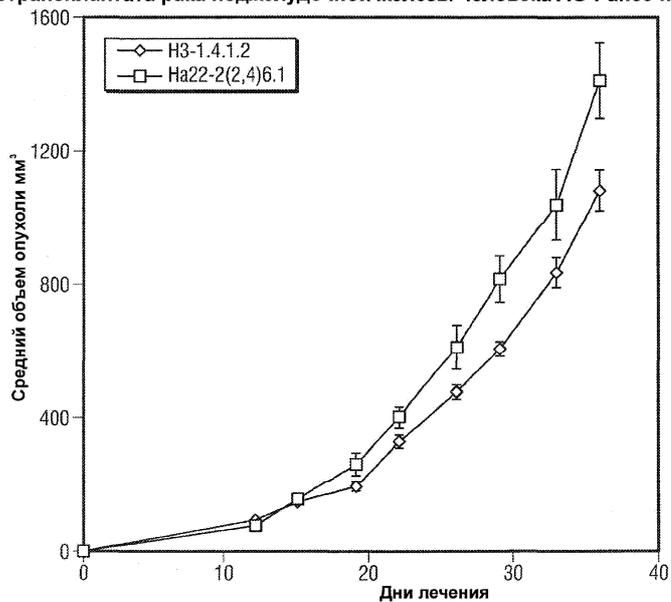
Фиг. 12

Оценка Ha22-2(2,4)6.1 МАв на подкожной модели формирования опухоли с использованием ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека HPAC на мышах SCID.



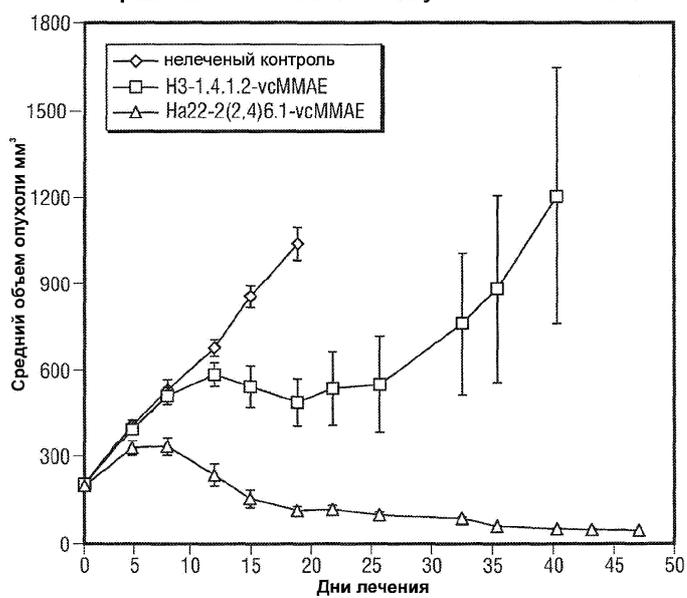
Фиг. 13

Оценка Ha22-2(2,4)6.1 МАв на подкожной модели формирования опухоли с использованием ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека AG-Panc3 на мышах SCID.



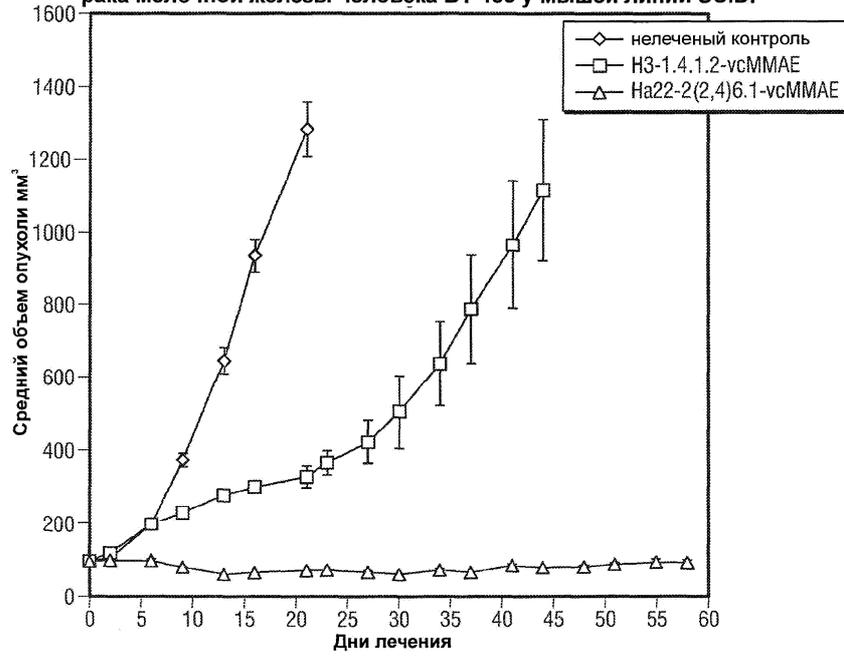
Фиг. 14

Эффективность Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожных ксенотрансплантатах рака легкого человека AG-L4 у мышей линии SCID.



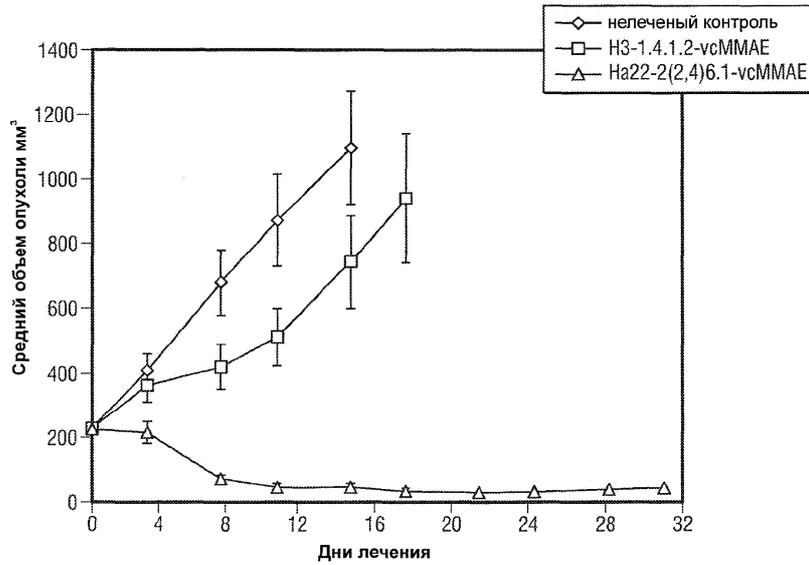
Фиг. 15

Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожных ксенотрансплантах рака молочной железы человека BT-483 у мышей линии SCID.



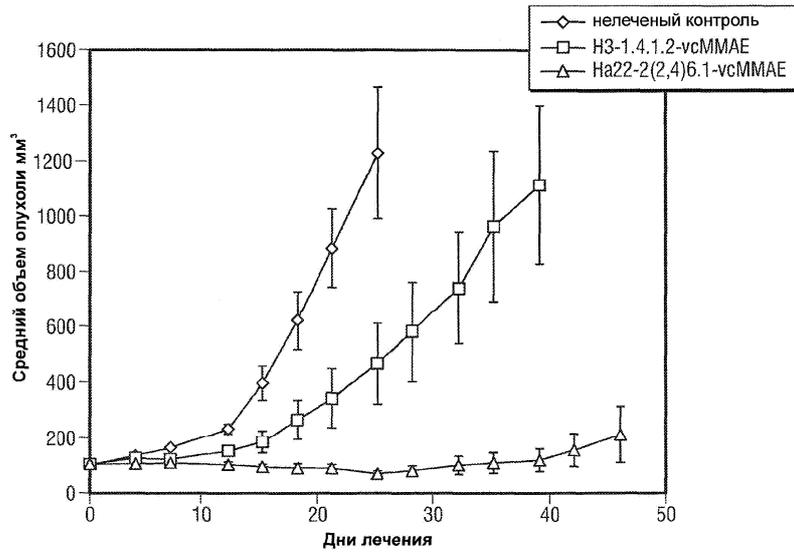
Фиг. 16

Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожных ксенотрансплантах рака мочевого пузыря человека AG-B1 на мышах SCID.



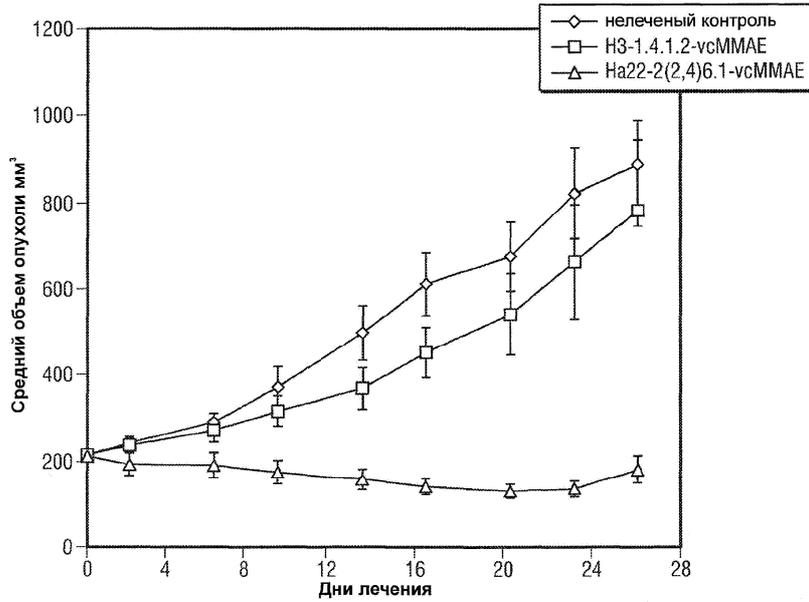
Фиг. 17

Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожных ксенотрансплантатах рака поджелудочной железы человека AG-Panc2 на мышах SCID.



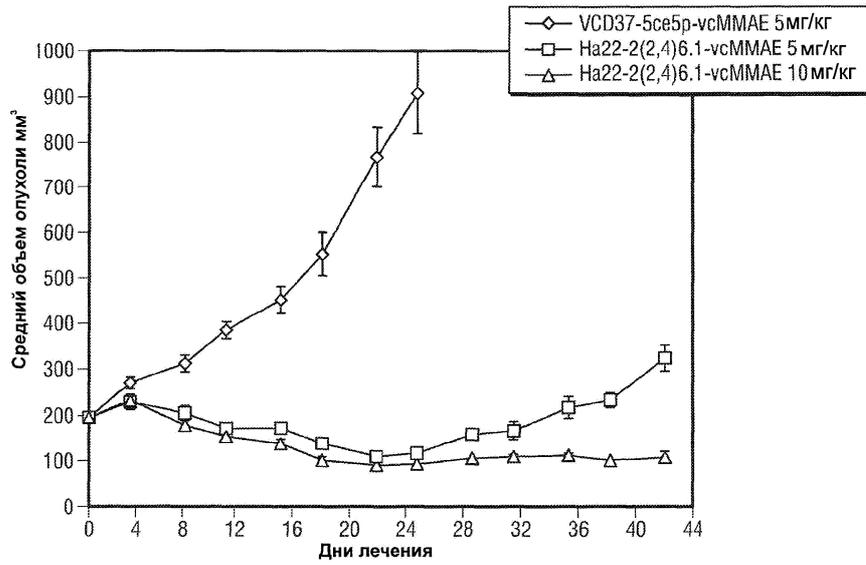
Фиг. 18

Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE на подкожных трансплантах рака легкого человека AG-Panc4 на мышах SCID.



Фиг. 19

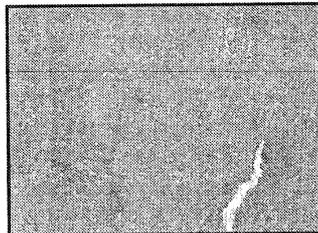
Эффективность Na22-2(2,4)6.1-vcMMAE в сравнительных дозировках на подкожных ксенотрансплантатах рака мочевого пузыря человека AG-B8 на мышах SCID.



Фиг. 20

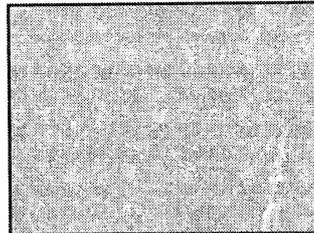
Обнаружение белка 191P4D12 в образцах раковых пациентов с помощью иммуногистохимического анализа.

Фиг. 21А



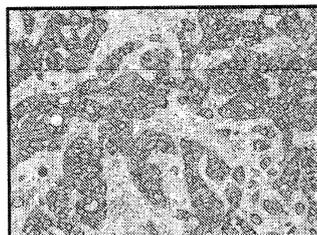
образец рака мочевого пузыря

Фиг. 21В



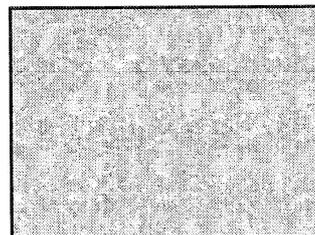
образец рака мочевого пузыря

Фиг. 21С



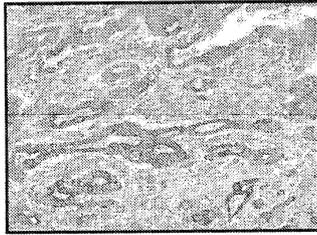
образец рака молочной железы

Фиг. 21D



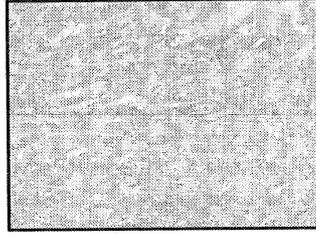
образец рака молочной железы

Фиг. 21Е



образец рака поджелудочной железы

Фиг. 21F



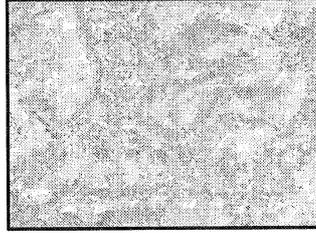
образец рака поджелудочной железы

Фиг. 21G



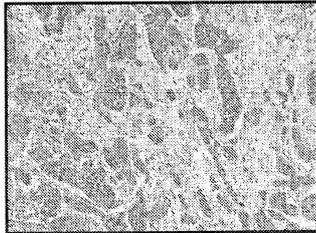
образец рака легких

Фиг. 21H



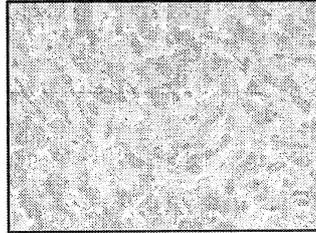
образец рака легких

Фиг. 21I



образец рака яичника

Фиг. 21J



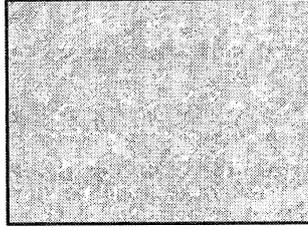
образец рака яичника

Фиг. 21K



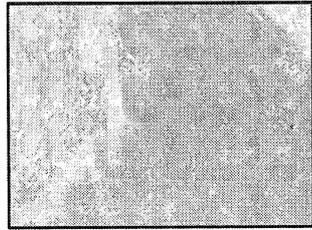
образцы рака пищевода

Фиг. 21L



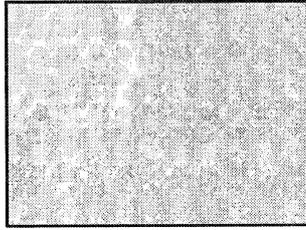
образцы рака пищевода

Фиг. 21M



образцы рака головы и шеи

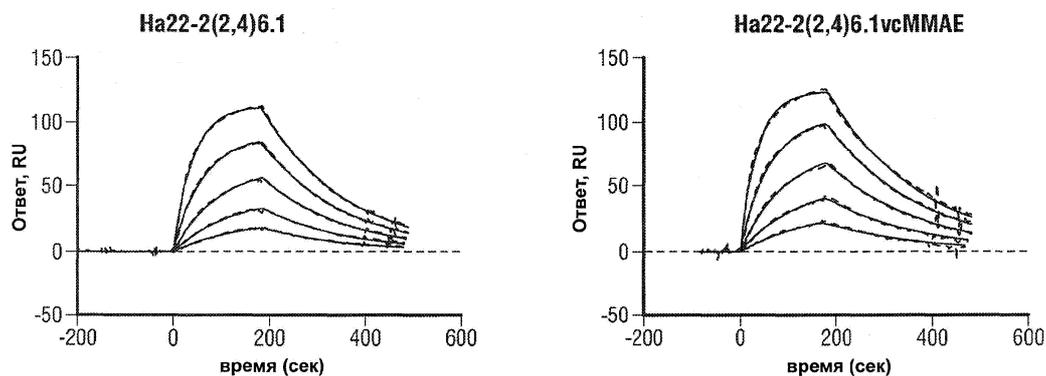
Фиг. 21N



образцы рака головы и шеи

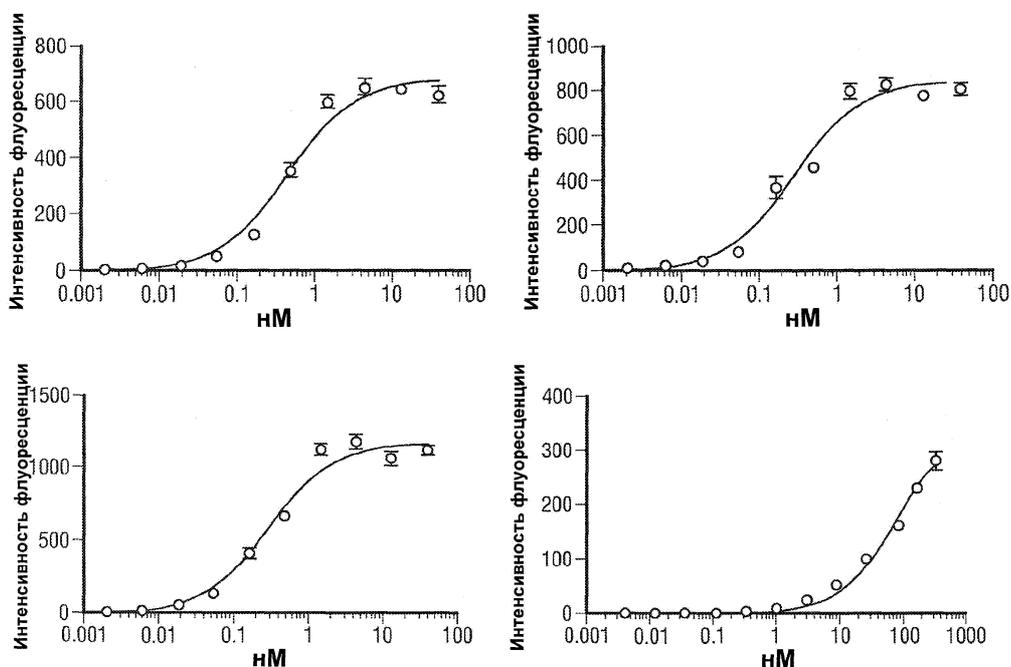
Фиг. 21

Кривые связывания (сенсограммы), использованные для определения аффинности посредством SRP

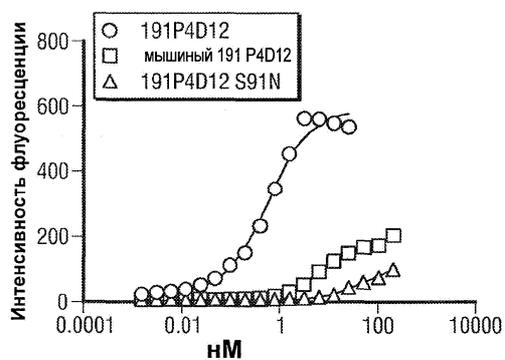


Фиг. 22

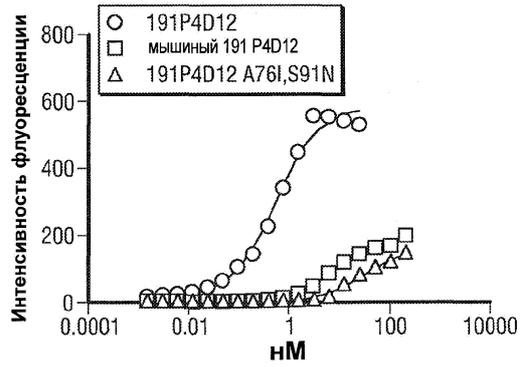
Na22-2(2,4)6.1 связывается с РС3 клетками, экспрессирующими 191 Р4D12 (А), и ортологами обезьяны циномогус (В), крысы (С) и мыши (D)



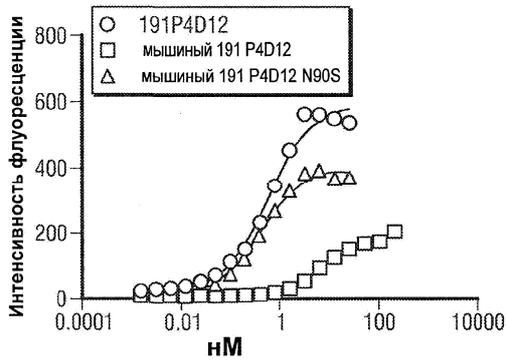
Фиг. 23



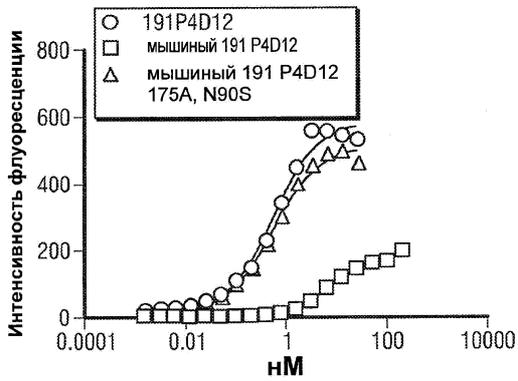
Фиг. 24А



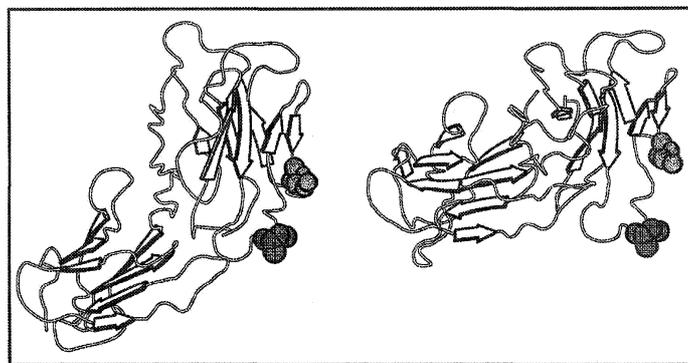
Фиг. 24В



Фиг. 24С



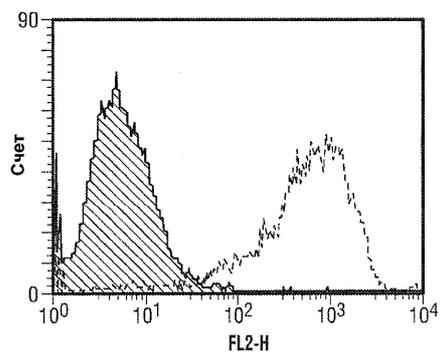
Фиг. 24D



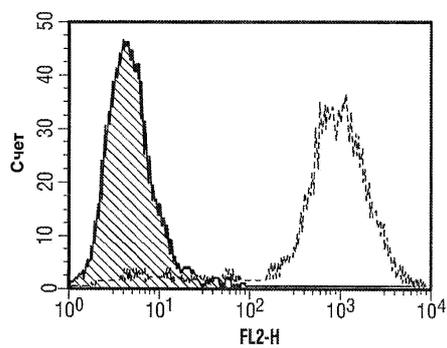
Фиг. 25

Связывание Na22-2(2,4)6.1 Mab, оцененное с помощью FACS

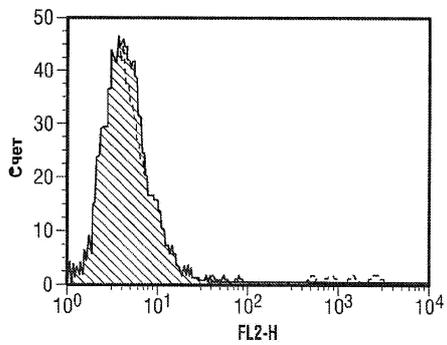
Фиг. 26А



Фиг. 26В



Фиг. 26С



Фиг. 26

