

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040898**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.12

(21) Номер заявки
201990839

(22) Дата подачи заявки
2013.08.23

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (ADC), КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С БЕЛКАМИ 158P1D7

(31) **61/692,448**

(32) **2012.08.23**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(62) **201500261; 2013.08.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭДЖЕНСИС, ИНК.; СИДЖЕН ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Моррисон Роберт Кендол, Эн Зили,
Моррисон Кэрен Джейн Мейрик,
Снайдер Джош, Цзя Сяо-Чи (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **US-A1-20050238649**
US-B2-7973140

JUNUTULA, JR et al. Site-Specific Conjugation of a Cytotoxic Drug to an Antibody Improves the Therapeutic Index. *Nature Biotechnology*. 20 July 2008, Vol. 26. No. 8, pp. 925-932; page 927, left column, second paragraph; page 927, right column, third paragraph; DOI:10.1038/nbt.1480

AFAR, D et al. Pfeclinical Validation of Anti-TMEFF2-Aurjstatin E-Conjugated Antibodies in the Treatment of Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. August 2004, Vol. 3, No. 8, pp. 921-932; page 923, left column, third paragraph; page 924, left column, third paragraph

US-A1-20090252728

(57) Описаны конъюгаты антител с лекарственными средствами (ADCs), которые связываются с белком 158P1D7, и их варианты. 158P1D7 проявляет тканеспецифическую экспрессию в нормальных зрелых тканях, но экспрессируется аномально при раковых заболеваниях, перечисленных в табл. 1. Следовательно, ADCs по изобретению обеспечивают терапевтические композиции для лечения рака.

B1**040898****040898 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка претендует на приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/692,448, поданной 23 августа 2012 г., содержание которой полностью включено путем ссылки.

Представление перечня последовательностей в виде текстового ASCII-файла

В виде текстового ASCII-файла путем ссылки во всей полноте сюда включено следующее содержание: компьютерная форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 511582005088SeqList.txt, дата записи: 21 августа 2013 г., размер: 40154 байт).

Область техники, к которой относится изобретение

Описанное здесь изобретение касается антител, их связывающих фрагментов и конъюгатов антител с лекарственными средствами (ADCs), которые связывают белки, именуемые 158P1D7. Изобретение также касается прогностических, профилактических и терапевтических способов и композиций, применимых при лечении раковых заболеваний, при которых экспрессируется 158P1D7.

Уровень техники

Рак является второй ведущей причиной смертности у людей после коронарной болезни сердца. Во всем мире от рака умирают миллионы людей каждый год. В одних только Соединенных Штатах, по данным Американского онкологического общества, рак является причиной смерти свыше полумиллиона человек в год, причем за год диагностируется более 1,2 млн. новых случаев. В то время, как смертность от сердечных заболеваний существенно снижается, смертность от рака в общем находится на подъеме. В начале следующего столетия, по прогнозам, рак станет ведущей причиной смертности.

Во всем мире несколько видов рака выделяются как ведущие убийцы. В частности, карцинома легких, простаты, молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, яичников и мочевого пузыря представляют главные причины смерти от рака. Эти и практически все другие карциномы имеют один общий летальный признак. За очень редкими исключениями, при карциноме фатальным является метастазирование. Более того, даже у тех больных раком, которые поначалу пережили первичный рак, общий опыт показал, что их жизнь резко менялась. Многие больные раком испытывают сильные опасения, обусловленные осознанием возможности рецидива или неэффективности лечения. Многие больные раком испытывают физическую нетрудоспособность после лечения. Кроме того, многие больные раком испытывают рецидивы.

Во всем мире рак простаты занимает четвертое место по распространенности у мужчин. В Северной Америке и Северной Европе это наиболее распространенная форма рака у мужчин и стоит на втором месте по смертности у мужчин. В одних только Соединенных Штатах более 30000 мужчин ежегодно умирают от этой болезни - уступая лишь раку легких. Несмотря на масштабность этих цифр, пока еще нет эффективного лечения метастатического рака простаты. Основными методами лечения остаются хирургическая простатэктомия, лучевая терапия, гормональная абляция, хирургическая кастрация и химиотерапия. К сожалению, для многих эти способы лечения являются неэффективными и зачастую связаны с нежелательными последствиями.

На диагностическом фронте отсутствие маркера опухоли простаты, способного точно выявлять локализованные опухоли на ранней стадии, остается существенным ограничением при диагностике и лечении этого заболевания. Хотя анализ специфичного антигена простаты в сыворотке (PSA) оказался очень полезным инструментом, однако его специфичность и вообще полезность широко рассматривается как недостаточная в некоторых важных аспектах.

Прогресс в идентификации дополнительных специфичных маркеров рака простаты был достигнут за счет получения ксенотрансплантатов рака простаты, которые могут воспроизводить различные стадии заболевания у мышей. Ксенотрансплантаты LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) представляют собой ксенотрансплантаты рака простаты, которые выжили при пассивировании у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) и проявили способность имитировать переход от андрогенной зависимости к независимости от андрогенов (Klein et al., 1997, Nat. Med. 3:402). Совсем недавно установленные маркеры рака простаты включают PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), специфичный мембранный антиген простаты (PSMA) (Pinto et al., Clin. Cancer Res. 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(25): 14523-8) и антиген стволовых клеток простаты (PSCA) (Reiter et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

Хотя ранее установленные маркеры типа PSA и способствовали усилиям по диагностике и лечению рака простаты, однако существует потребность в идентификации дополнительных маркеров и терапевтических мишеней для рака простаты и родственных раковых заболеваний с целью дальнейшего улучшения диагностики и терапии.

В 2000 г. отмечалось 130200 случаев колоректального рака в США, в том числе 93800 случаев рака толстой кишки и 36400 случаев рака прямой кишки. Колоректальный рак занимает третье место по распространенности у мужчин и женщин. Его встречаемость значительно уменьшилась в течение 1992-1996 г. (-2,1% в год). Исследования показывают, что это снижение произошло из-за усиления скрининга и удаления полипов, что предотвращает их прогрессирование в инвазивный рак. В 2000 г. отмечалось 56300 смертей (47700 от рака толстой кишки, 8600 от рака прямой кишки), что составляет около 11% всех случаев смерти от рака в США.

В настоящее время наиболее распространенной формой терапии колоректального рака является хирургия, которая часто ведет к излечению при таком раке, который не распространяется. До или после операции проводится химиотерапия или химиотерапия плюс облучение для большинства пациентов, у которых рак глубоко перфорировал стенки кишечника или распространился на лимфатические узлы. При раке толстой кишки иногда требуется перманентная колостомия (создание брюшного отверстия для удаления отходов организма), которая редко необходима при ректальном раке. По-прежнему существует потребность в эффективных способах диагностики и лечения колоректального рака.

Из всех новых случаев рака в США рак мочевого пузыря составляет примерно 5% у мужчин (пятое место по частоте новообразований) и 3% у женщин (восьмое место по частоте новообразований). Его встречаемость медленно возрастает, одновременно со старением населения. В 1998 г. насчитывалось 54500 случаев, в том числе 39500 у мужчин и 15000 у женщин. С поправкой на возраст его встречаемость в США составляет 32 на 100000 мужчин и 8 на 100000 женщин. Историческое соотношение 3:1 между мужчинами и женщинами может снижаться в связи с распространением курения у женщин. В 1998 г. отмечалось 11000 случаев смерти от рака мочевого пузыря (7800 у мужчин и 3900 у женщин). Заболеваемость раком мочевого пузыря и смертность сильно возрастают с возрастом и будут составлять все более серьезную проблему по мере старения населения.

В большинстве случаев рак мочевого пузыря дает рецидивы в мочевом пузыре. Рак мочевого пузыря лечат сочетанием трансуретральной резекции мочевого пузыря (TUR) и внутривезикулярной химиотерапии или иммунотерапии. Многоочаговый и рецидивирующий характер рака мочевого пузыря указывает на ограниченность TUR. Большинство случаев мышечно-инвазивного рака не излечивается лишь одной TUR. Наиболее эффективным средством устранения рака является радикальная цистэктомия с отведением мочи, но она оказывает неоспоримое влияние на мочеиспускательную и половую функции. Здесь по-прежнему существует значительная потребность в таких методах лечения, которые будут благотворными для больных раком мочевого пузыря.

В 2000 г. отмечалось 164100 новых случаев рака легких и бронхов, что составляет 14% от всех диагнозов рака в США. Встречаемость рака легких и бронхов значительно снижается у мужчин, с высокого 86,5 на 100000 в 1984 г. до 70,0 в 1996 г. В 1990-е годы темпы роста среди женщин начали замедляться. В 1996 г. его встречаемость у женщин составляла 42,3 на 100000.

В 2000 г. рак легких и бронхов вызвал примерно 156900 смертей, что составляет 28% всех случаев смерти от рака. В 1992-1996 г. смертность от рака легких значительно уменьшилась среди мужчин (-1,7% в год), тогда как у женщин она все еще значительно увеличивается (0,9% в год). С 1987 г. от рака легких каждый год умирает больше женщин, чем от рака молочной железы, который на протяжении более 40 лет был главной причиной смертности от рака у женщин. Уменьшение заболеваемости раком легких и смертности, скорее всего, произошло в результате снижения распространенности курения за прошедшие 30 лет; однако снижение распространенности курения среди женщин отстает от мужчин. Вызывает озабоченность то, что, несмотря на снижение потребления табака у взрослых, употребление табака у молодых людей опять возрастает.

Способы лечения рака легких и бронхов зависят от типа и стадии рака и включают хирургию, лучевую терапию и химиотерапию. Для многих видов локализованного рака, как правило, лучшим методом является хирургия. Поскольку ко времени ее выявления болезнь обычно уже распространяется, то зачастую требуется лучевая терапия и химиотерапия в комбинации с хирургией. Химиотерапия, сама по себе или в комбинации с лучевой терапией, является лучшим способом лечения мелкоклеточного рака легких; при этом большой процент пациентов испытывает ремиссию, которая в некоторых случаях является долгосрочной. Однако все еще существует потребность в эффективных способах лечения и диагностики рака легких и бронхов.

В 2000 г. в США отмечалось 182800 новых случаев инвазивного рака молочной железы у женщин. Кроме того, в 2000 г. отмечалось около 1400 новых случаев рака молочной железы у мужчин. После возрастания примерно на 4% в год в 1980-е годы, встречаемость рака молочной железы у женщин вышла на плато в 1990-х годах, около 110,6 случаев на 100000.

В 2000 г. только в США отмечалось 41200 смертей (40800 женщины, 400 мужчин) в связи с раком молочной железы. Рак молочной железы занимает второе место по смертности от рака у женщин. По самым последним данным уровень смертности значительно снизился в 1992-1996 г., при наибольшем снижении у молодых женщин, как белых, так и черных. Вероятно, такое снижение, было результатом раннего выявления и улучшенного лечения.

Принимая во внимание медицинские обстоятельства и предпочтения пациента, лечение рака молочной железы может включать люмпэктомию (локальное удаление опухоли) и удаление лимфатических узлов под мышками; мастэктомию (хирургическое удаление груди) и удаление лимфатических узлов под мышками; лучевую терапию; химиотерапию; или гормональную терапию. Зачастую применяются два или несколько методов в комбинации. Многочисленные исследования показали, что на ранних стадиях заболевания долгосрочная выживаемость после люмпэктомии плюс лучевой терапии близка к выживаемости после модифицированной радикальной мастэктомии. Значительные успехи в методах реконструкции

обеспечивают несколько вариантов для реконструкции груди после мастэктомии. В последнее время такая реконструкция проводится одновременно с мастэктомией.

Местное иссечение карциномы протоков *in situ* (DCIS) с достаточным количеством окружающей нормальной ткани груди может предотвратить местные рецидивы DCIS. Облучение груди и/или тамоксифен могут уменьшить вероятность возникновения DCIS в оставшейся ткани молочной железы. Это важно потому, что DCIS, если ее не лечить, может развиться в инвазивный рак молочной железы. Тем не менее, есть серьезные побочные эффекты или осложнения от этих процедур. Поэтому существует потребность в эффективных способах лечения рака молочной железы.

В 2000 г. в США отмечалось 23100 новых случаев рака яичников. Это составило 4% всех случаев рака среди женщин и заняло второе место среди гинекологических раковых заболеваний. В 1992-1996 г. встречаемость рака яичников значительно сократилась. В 2000 г. отмечалось 14000 случаев смерти от рака яичников. Рак яичников вызывает больше смертей, чем любой другой рак женской репродуктивной системы.

Способы лечения рака яичников - хирургия, лучевая терапия и химиотерапия. Операция обычно включает удаление одного или обоих яичников, фаллопиевых труб (маточных труб) и матки (гистерэктомия). При некоторых очень ранних стадиях опухолей удаляется только пораженный яичник, особенно у молодых женщин, желающих иметь детей. На поздних стадиях заболевания следует удалять все пораженные внутрибрюшные части для усиления эффекта химиотерапии. По-прежнему существует важная потребность в эффективных способах лечения рака яичников.

В 2000 г. отмечалось 28300 новых случаев рака поджелудочной железы. За последние 20 лет встречаемость рака поджелудочной железы уменьшилась у мужчин. Встречаемость среди женщин остается примерно постоянной, но может начаться снижение. В США рак поджелудочной железы вызвал примерно 28200 смертей в 2000 г. За последние 20 лет отмечалось небольшое, но достоверное снижение смертности среди мужчин (примерно -0,9% в год), тогда как у женщин она слегка возросла.

Способы лечения рака поджелудочной железы - хирургия, лучевая терапия и химиотерапия. Эти способы лечения могут увеличить выживаемость и/или устранить симптомы у многих пациентов, но вряд ли они обеспечат излечение у большинства.

Существует значительная потребность в дополнительных способах лечения и диагностики рака. Они включают использование антител, вакцин и небольших молекул в качестве средств лечения. Кроме того, существует и потребность в использовании этих средств в качестве инструментов для исследований по диагностике, выявлению, мониторингу и развитию уровня техники во всех областях лечения и исследования рака.

Реализуется терапевтическое применение моноклональных антител (mAbs) (G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)). Моноклональные антитела уже утверждены в качестве лечебных средств при трансплантации, раковых, инфекционных, сердечно-сосудистых заболеваниях и воспалении. Различные изоформы имеют различные эффекторные функции. Такие различия в функции отражаются в различных 3-мерных структурах для различных изоформ иммуноглобулина (P.M. Alzari et al., *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988)).

Поскольку мыши удобны для иммунизации и распознают большинство антигенов человека как чужеродные, то mAbs против человеческих мишеней с терапевтическим потенциалом, как правило, происходили из мышей. Однако мышиные моноклональные антитела имеют присущие им недостатки в качестве терапии для человека. Они требуют более частого приема, так как mAbs имеют более короткий период полужизни при циркуляции в организме человека, чем человеческие антитела. Что еще важнее, повторное введение мышиных антител в иммунную систему человека вызывает реакцию иммунной системы человека на распознавание белка мыши в качестве чужеродного и реакцию типа человеческих антител против мыши (НАМА). Такая реакция НАМА может привести к аллергической реакции и быстрой элиминации мышиных антител из системы, тем самым делая применение мышиных антител бесполезным. Чтобы избежать таких эффектов, делались попытки создания иммунной системы человека в организме мышей.

Сначала попытались создать трансгенных мышей, способных реагировать на антигены антителами, содержащими человеческие последовательности (см. Bruggemann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6709-6713 (1989)), но они были ограничены количеством ДНК, которое может стабильно содержаться в имеющихся векторах для клонирования. Использование клонирующих векторов типа искусственной хромосомы дрожжей (YAC) проложило путь к введению больших гаметных фрагментов локуса Ig человека трансгенным млекопитающим. Практически большинство генов областей V, D и J человека, расположенных с теми же интервалами, что и в геноме человека, и константных областей человека вводили мышам с помощью YACs. Одна из таких трансгенных линий мышей известна как XenoMouse® и коммерчески доступна от Amgen Fremont, Inc. (Fremont, CA).

Сущность изобретения

Изобретением предусмотрены антитела, их связывающие фрагменты и конъюгаты антител с лекарственными средствами (ADCs), которые связываются с белком 158P1D7 и полипептидными фрагментами белка 158P1D7. В некоторых воплощениях изобретение включает полностью человеческие антитела,

конъюгированные с терапевтическими средствами. В некоторых воплощениях имеется условие, что кодируется не вся последовательность нуклеиновой кислоты из фиг. 3 и/или получается не вся аминокислотная последовательность из фиг. 2. В некоторых воплощениях кодируется вся последовательность нуклеиновой кислоты из фиг. 3 и/или получается вся аминокислотная последовательность из фиг. 2, причем любая из них находится в соответствующих стандартных дозовых формах для человека.

Изобретением также предусмотрены различные иммуногенные или терапевтические композиции, такие как конъюгаты антитело-лекарственное средство, и способы лечения таких раковых заболеваний, при которых экспрессируется 158P1D7, как-то рака тканей, перечисленных в табл. I, в особенности рака мочевого пузыря.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. На фиг. 1 представлена кДНК и аминокислотная последовательность 158P1D7. Начальный метионин подчеркнут. Открытая рамка считывания простирается от нуклеотида 23 до 2548, включая стоп-кодон.

Фиг. 2. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность антител к 158P1D7. На фиг. 2A представлена кДНК и аминокислотная последовательность тяжелой цепи Ha15-10ac12. Варибельная область тяжелой цепи подчеркнута дважды, а константная область тяжелой цепи IgG2 человека подчеркнута. На фиг. 2B представлена кДНК и аминокислотная последовательность легкой цепи Ha15-10ac12. Варибельная область легкой цепи подчеркнута дважды, а константная область каппа-цепи человека подчеркнута.

Фиг. 3. Аминокислотная последовательность антител к 158P1D7. На фиг. 3A представлена аминокислотная последовательность тяжелой цепи Ha15-10ac12. Варибельная область тяжелой цепи подчеркнута дважды, а константная область тяжелой цепи IgG2 человека подчеркнута. На фиг. 3B представлена аминокислотная последовательность легкой цепи Ha15-10ac12. Варибельная область легкой цепи подчеркнута дважды, а константная область каппа-цепи человека подчеркнута.

Фиг. 4. Выравнивание антител Ha15-10ac12 с гаметным Ig человека. На фиг. 4A представлено выравнивание тяжелой цепи Ha15-10ac12 (SEQ ID NO: 3, позиции 1-360; SEQ ID NO: 4, позиции 1-120) с гаметным Ig человека. На фиг. 4B представлено выравнивание легкой цепи Ha15-10ac12 (SEQ ID NO: 5, позиции 1-240; SEQ ID NO: 6, позиции 1-80) с гаметным Ig человека IGKV2D-28*01 (SEQ ID NO: 10).

Фиг. 5. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека AG-B7 у мышей SCID.

Фиг. 6. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека RT-4-XCL у мышей SCID.

Фиг. 7. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака легких человека NCI-H322M-XCL у мышей SCID.

Фиг. 8. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека AG-B7 у мышей SCID.

Фиг. 9. Выявление белка 158P1D7 в образцах раковых больных методом ИНС. На фиг. 9A и 9B представлены образцы рака мочевого пузыря. На фиг. 9C и 9D представлены образцы рака молочной железы. На фиг. 9E и 9F представлены образцы рака легких. На фиг. 9G и 9H представлены образцы глиобластомы.

Фиг. 10. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека SW780 у мышей SCID.

Фиг. 11. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE in vitro при анализе цитотоксичности для CHP-212 по сравнению с mAb M15-68(2)18 (иначе 68(18)1.1).

Фиг. 12. Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно полученных от пациента ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека AG-B8 у мышей SCID.

Фиг. 13. Кривая насыщения для Ha15-10ac12vcMMAE.

Фиг. 14. Гистограмма, показывающая среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) Ha15-10ac12vcMMAE.

Фиг. 15. Оценка цитотоксичности Ha15-10ac12vcMMAE in vitro. Фиг. 15(A) - на клетках CHP-212, фиг. 15(B) - на клетках IGROV-1.

Раскрытие сущности изобретения

Оглавление по разделам.

I. Определения.

II. Антителах 158P1D7.

III. Конъюгаты антитело-лекарственное средство вообще.

III(A). Майтансиноиды.

III(B). Ауристатин и доластатин.

III(C). Калихеамицин.

III(D). Другие цитотоксические вещества.

IV. Конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые связывают 158P1D7.

V. Звено линкера.

- VI. Звено удлинителя.
- VII. Аминокислотное звено.
- VIII. Звено спейсера.
- IX. Звено лекарственного средства.
- X. Нагрузка лекарственным средством.
- XI. Методы определения цитотоксического эффекта ADCs.
- XII. Лечение рака, экспрессирующего 158P1D7.
- XIII. 158P1D7 как мишень для терапии на основе антител.
- XIV. Коктейли с ADC к 158P1D7.
- XV. Комбинированная терапия.
- XVI. Наборы/промышленные изделия.
- I. Определения.

Если не указано иначе, все профессиональные термины, обозначения и другие научные термины или используемые здесь терминологии имеют общепринятые значения, понятные специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определяются здесь для ясности и/или для справки, а включение сюда таких определений не обязательно должно истолковываться как представляющее существенное отличие от того, что вообще принято в данной области. Многие из описанных или приведенных здесь методов и процедур хорошо известны и широко применяются по стандартной методологии специалистами в данной области, такие, к примеру, как широко используемые 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, связанные с использованием коммерчески доступных наборов и реагентов, обычно выполняются в соответствии с установленными производителем методиками и/или параметрами, если не указано иначе.

При использовании в данном документе торговых марок ссылка на торговую марку также относится к составу лекарственного средства, непатентованным лекарственным средствам и активным фармацевтическим ингредиентам лекарственных средств с этой торговой маркой, если из контекста не следует иное.

Термины "запущенный рак", "локально прогрессирующий рак", "запущенное заболевание" и "локально прогрессирующее заболевание" означают такой рак, который пробился через капсулу соответствующей ткани, и охватывают стадию C заболевания по системе American Urological Association (AUA), стадии C1-C2 заболевания по системе Whitmore-Jewett и стадии T3-T4 и N+ заболевания по системе TNM (опухоль, узел, метастазы). В общем, пациентам с локально прогрессирующим заболеванием не рекомендуется операция, и эти пациенты имеют существенно менее благоприятные исходы, чем пациенты с клинически локализованным (в рамках одного органа) раком.

Сокращение "AFP" означает диметилвалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин-п-фенилендиамин (см. формулу XVI ниже).

Сокращение "MMAE" означает монометилауристатин E (см. формулу XI ниже).

Сокращение "AEB" означает сложный эфир, полученный при реакции ауристатина E с парацетилбензойной кислотой (см. формулу XX ниже).

Сокращение "AEVB" означает сложный эфир, полученный при реакции ауристатина E с бензоилвалерьяновой кислотой (см. формулу XXI ниже).

Сокращение "MMAF" означает довалин-валин-долаизолейин-долапроин-фенилаланин (см. формулу XIV ниже).

Если не указано иначе, термин "алкил" относится к насыщенным линейным или разветвленным углеводородам, содержащим от 1 до 20 атомов углерода (и ко всем комбинациям и подкомбинациям интервалов и конкретных количеств атомов углерода в них), предпочтительно от 1 до 8 атомов углерода. Примерами алкильных групп являются метил, этил, н-пропил, изо-пропил, н-бутил, изо-бутил, 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, сами по себе или в составе другой группы, необязательно могут быть замещены одной или несколькими группами, предпочтительно от 1 до 3 групп (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогенов), включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила, причем группы -O-(C₁-C₈-алкил), -O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил), -арил, -C₁-C₈-алкил, C₂-C₈-алкенил и -C₂-C₈-алкинил необязательно могут быть дополнительно замещены одной или несколькими группами, включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила.

Если не указано иначе, термины "алкенил" и "алкинил" относятся к прямым или разветвленным углеродным цепям, содержащим от 2 до 20 атомов углерода (и ко всем комбинациям и подкомбинациям интервалов и конкретных количеств атомов углерода в них), предпочтительно от 2 до 8 атомов углерода. Алкенильная цепь содержит по крайней мере одну двойную связь в цепи, а алкинильная цепь содержит по крайней мере одну тройную связь в цепи. Примеры алкенильных групп включают, без ограничения, этилен или винил, аллил, бутенил -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутилен, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил и -2,3-диметил-2-бутенил. Примеры алкинильных групп включают, без ограничения, ацетилен, пропаргил, ацетилен, пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил.

Алкенильные и алкинильные группы, сами по себе или в составе другой группы, необязательно могут быть замещены одной или несколькими группами, предпочтительно от 1 до 3 групп (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогенов), включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила, причем группы -O-(C₁-C₈-алкил), -O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил), -арил, -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил и -C₂-C₈-алкинил необязательно могут быть дополнительно замещены одной или несколькими группами, включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила.

Если не указано иначе, термин "алкилен" относится к насыщенным углеводородным радикалам с разветвленной или прямой цепью, содержащим от 1 до 20 атомов углерода (и ко всем комбинациям и подкомбинациям интервалов и конкретных количеств атомов углерода в них), предпочтительно от 1 до 8 атомов углерода, которые содержат два одновалентных радикальных центра, возникших при удалении двух атомов водорода из одного и того же или двух различных атомов углерода у исходного алкана. Типичные алкилены включают, без ограничения, метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентиле, гексиле, гептилен, октилен, нонилен, декален, 1,4-циклогексиле и др. Алкиленовые группы, сами по себе или в составе другой группы, могут быть необязательно замещены одной или несколькими группами, предпочтительно от 1 до 3 групп (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогенов), включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила, причем группы -O-(C₁-C₈-алкил), -O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил), -арил, -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил и -C₂-C₈-алкинил необязательно могут быть дополнительно замещены одной или несколькими группами, включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила.

Если не указано иначе, термин "алкенилен" относится к необязательно замещенным алкиленовым группам, содержащим по крайней мере одну двойную связь углерод-углерод. Примеры алкениленовых групп включают, к примеру, этенилен (-CH=CH-) и пропенилен (-CH=CHCH₂-).

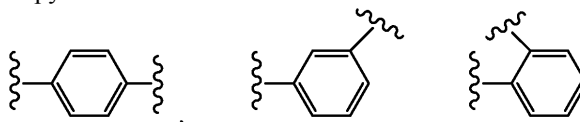
Если не указано иначе, термин "алкинилен" относится к необязательно замещенным алкиленовым группам, содержащим по крайней мере одну тройную связь углерод-углерод. Примеры алкиниленовых групп включают, к примеру, ацетилен (-C≡C-), пропаргил (-CH₂C≡C-) и 4-пентинил (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).

Если не указано иначе, термин "арил" относится к одновалентным ароматическим углеводородным радикалам, содержащим от 6 до 20 атомов углерода (и ко всем комбинациям и подкомбинациям интервалов и конкретных количеств атомов углерода в них), возникшим при удалении одного атома водорода из одного атома углерода в исходной ароматической кольцевой системе. Некоторые арильные группы в типичных структурах представлены как "Ar". Типичные арильные группы включают, без ограничения, радикалы, происходящие из бензола, замещенного бензола, фенила, нафталина, антрацена, бифенила и др.

Арильная группа, сама по себе или в составе другой группы, необязательно может быть замещена одной или несколькими, предпочтительно от 1 до 5 или даже от 1 до 2 групп, включая, без ограничения, -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, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила, причем группы -C₁-C₈-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 -арил необязательно могут быть дополнительно замещены одной или несколькими группами, включая, без ограничения, $-C_1-C_8$ -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 выбран из $-H$, $-C_1-C_8$ -алкила, $-C_2-C_8$ -алкенила, $-C_2-C_8$ -алкинила и -арила.

Если не указано иначе, термин "арилен" относится к таким необязательно замещенным арильным группам, которые являются двухвалентными (т.е. возникли при удалении двух атомов водорода из одного и того же или двух разных атомов углерода у исходной ароматической кольцевой системы) и могут находиться в орто-, мета- или пара-конфигурации, как показано на следующих структурах с фенилом в качестве примера арильной группы:



при этом арильная группа (например, фенильная группа) может быть незамещенной или замещенной. В некоторых воплощениях арилен представлен замещенным ариленом, который замещен вплоть до четырьмя группами, включая, без ограничения, $-C_1-C_8$ -алкил, $-O-(C_1-C_8$ -алкил), -арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, -галоген, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$, где каждый R' независимо выбран из H , $-C_1-C_8$ -алкила и -арила.

Если не указано иначе, термин "гетероцикл" относится к моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, содержащим от 3 до 14 атомов в кольце (также называются кольцевыми), причем по меньшей мере один кольцевой атом по меньшей мере в одном кольце представляет собой гетероатом, выбранный из N , O , P и S (и ко всем комбинациям и подкомбинациям интервалов и конкретных количеств атомов углерода и гетероатомов в них). Гетероцикл может содержать от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, выбранных независимо из N , O , P и S . Один или несколько атомов N , C или S в гетероцикле могут быть окисленными. Моноциклические гетероциклы предпочтительно содержат от 3 до 7 кольцевых атомов (например, от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных независимо из N , O , P и S), а бициклические гетероциклы предпочтительно содержат от 5 до 10 кольцевых атомов (например, от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных независимо из N , O , P и S). Кольцо, которое включает в себя гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не указано иначе, гетероцикл присоединяется к своей подвесной группе по любому гетероатому или атому углерода, приводящему к образованию стабильной структуры.

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

Примеры "гетероциклических" групп включают, в качестве примера, но без ограничения, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталинил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азацинил, триазилил, 6H-1,2,5-тиадазилил, 2H,6H-1,5,2-дифтазилил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, 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, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолинил и изатиноил. Предпочтительные "гетероциклические" группы включают, без ограничения, бензофуранил, бензотиофенил, индолил, бензопиразолил, кумаринил, изохинолинил, пирролил, тиофенил, фуранил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, триазолил, хинолинил, пиримидинил, пиридинил, пиридонил, пиразинил, пиридазинил, изотиазолил, изоксазолил и тетразолил.

Гетероциклические группы, сами по себе или в составе другой группы, необязательно могут быть замещены одной или несколькими группами, предпочтительно 1-2 группами, включая, без ограничения, $-C_1-C_8$ -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 выбран из $-H$, $-C_1-C_8$ -алкила, $-C_2-C_8$ -алкенила, $-C_2-C_8$ -алкинила и -арила, а группы $-O-(C_1-C_8$ -алкил),

-O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил), -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил, -C₂-C₈-алкинил и -арил необязательно могут быть дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила.

В качестве примера, но без ограничения, связанные через углерод гетероциклы могут соединяться по следующим положениям: положение 2, 3, 4, 5 или 6 у пиридина; положение 3, 4, 5 или 6 у пиридазина; положение 2, 4, 5 или 6 у пиримидина; положение 2, 3, 5 или 6 у пиазина; положение 2, 3, 4 или 5 у фурана, тетрагидрофурана, тифурана, тифена, пиррола или тетрагидропиррола; положение 2, 4 или 5 у оксазола, имидазола или тиазола; положение 3, 4 или 5 у изоксазола, пиазола или изотиазола; положение 2 или 3 у азиридина; положение 2, 3 или 4 у азетидина; положение 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 у хинолина; или положение 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 у изохинолина. Наиболее типичные гетероциклы, связанные через углерод, включают 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 5-пиридил, 6-пиридил, 3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил, 6-пиридазинил, 2-пиримидинил, 6-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил, 2-пиазинил, 3-пиазинил, 5-пиазинил, 6-пиазинил, 2-тиазолил, 4-тиазолил и 5-тиазолил.

В качестве примера, но без ограничения, связанные через азот гетероциклы могут соединяться по следующим положениям: положение 1 у азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиазола, пиазолина, 2-пиазолина, 3-пиазолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина или 1H-индазола; положение 2 у изоиндола или изоиндолина; положение 4 у морфолина; и положение 9 у карбазола или β-карболина. Наиболее типичные гетероциклы, связанные через азот, включают 1-азиридил, 1-азетидил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиазолил и 1-пиперидинил.

Если не указано иначе, термин "карбоцикл" относится к насыщенным или ненасыщенным неароматическим моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, содержащим от 3 до 14 атомов в кольце (и ко всем комбинациям и подкомбинациям интервалов и конкретных количеств атомов углерода в них), причем все атомы в кольце представлены атомами углерода. Моноциклические карбоциклы предпочтительно содержат от 3 до 6 атомов в кольце, еще более предпочтительно 5 или 6 атомов в кольце. Бициклические карбоциклы предпочтительно содержат от 7 до 12 атомов в кольце, например, расположенных в виде бициклосистемы [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6], или же 9 или 10 атомов в кольце, расположенных в виде бициклосистемы [5,6] или [6,6]. Термин "карбоцикл" включает, к примеру, моноциклическое карбоциклическое кольцо, конденсированное с арильным кольцом (к примеру, моноциклическое карбоциклическое кольцо, конденсированное с бензольным кольцом). Карбоциклы предпочтительно содержат от 3 до 8 атомов углерода в кольце.

Карбоциклические группы, сами по себе или в составе другой группы, необязательно могут быть замещены, к примеру, одной или несколькими группами, предпочтительно 1-2 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогенов), включая, без ограничения, -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, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN, где каждый R' независимо выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила, а группы -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил, -C₂-C₈-алкинил, -O-(C₁-C₈-алкил), -O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил) и -арил необязательно могут быть дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включая, без ограничения, -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 выбран из -H, -C₁-C₈-алкила, -C₂-C₈-алкенила, -C₂-C₈-алкинила и -арила.

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

"Карбоцикло", сами по себе или в составе другой группы, обозначают такие необязательно замещенные карбоциклические группы, как определено выше, которые являются двухвалентными (т.е. они получаются при удалении двух атомов водорода из одного и того же или двух различных атомов углерода у исходной карбоциклической кольцевой системы).

Если не указано иначе по контексту, дефис (-) обозначает точку присоединения к основной молекуле. Соответственно, термин "-(C₁-C₈-алкилен)арил" или "-C₁-C₈-алкилен(арил)" относится к таким радикалам C₁-C₈-алкиленов, как определено здесь, у которых радикал алкилена присоединяется к основной молекуле по любому из атомов углерода у радикала алкилена, а один из атомов водорода, связанных с атомом углерода радикала алкилена, заменен на радикал арила, как определено здесь. Типичные группы

"-(C₁-C₈-алкилен)арил", "-(C₂-C₈-алкенилен)арил", и "-(C₂-C₈-алкинилен)арил" включают, без ограничения, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и др.

Если определенная группа "замещена", то эта группа может содержать один или несколько заместителей, предпочтительно от 1 до 5 заместителей, более предпочтительно от 1 до 3 заместителей, наиболее предпочтительно от 1 до 2 заместителей, выбранных независимо друг от друга из перечня заместителей. Однако эта группа вообще может иметь любое количество заместителей, выбранных из галогенов. При этом указываются группы, которые замещаются.

Предполагается, что определение любых заместителей или переменных по определенному положению в молекуле не зависит от их определений по другим положениям в этой молекуле. Предполагается, что заместители и профили замещения у соединений по изобретению могут быть выбраны рядовым специалистом так, чтобы получались соединения, которые будут химически стабильными и могут быть легко синтезированы известными методами, а также изложенными здесь способами.

Защитные группы в настоящем описании означают такие группы, которые избирательно блокируют, будь то временно или постоянно, один реакционноспособный сайт у многофункционального соединения. Подходящие для настоящего изобретения защитные группы для гидроксила должны быть фармацевтически приемлемыми и не обязательно должны отщепляться от исходного соединения после введения субъекту для того, чтобы соединение было активным. Отщепление происходит посредством нормальных метаболических процессов в организме. Защитные группы для гидроксила хорошо известны в данной области, см. *Protective Groups in Organic Synthesis* by T.W. Greene and P.G.M. Wuts (John Wiley & Sons, 3rd Ed.), включенную сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи, причем они включают, к примеру, защитные группы типа простых эфиров (например, алкиловые эфиры и силиловые эфиры, включая, к примеру, диалкилсилиловые эфиры, триалкилсилиловые эфиры, диалкилалкоксисилиловые эфиры), сложных эфиров, карбонатов, карбаматов, сульфатов и фосфатов. Примеры защитных групп для гидроксила включают, без ограничения, метиловый эфир; метоксиметиловый эфир, метилтиометиловый эфир, (фенилдиметилсилил)метоксиметиловый эфир, бензилоксиметиловый эфир, п-метоксибензилоксиметиловый эфир, п-нитробензилоксиметиловый эфир, о-нитробензилоксиметиловый эфир, (4-метоксифеноксид)метиловый эфир, гваяколометиловый эфир, трет-бутоксиметиловый эфир, 4-пентилоксиметиловый эфир, силоксиметиловый эфир, 2-метоксиэтоксиметиловый эфир, 2,2,2-трихлорэтоксиметиловый эфир, бис-(2-хлорэтоксид)метиловый эфир, 2-(триметилсилил)этоксиметиловый эфир, метоксиметиловый эфир, тетрагидропирираниловый эфир, 1-метоксициклогексильный эфир, 4-метокситетрагидропирираниловый эфир, S,S-диоксид 4-метокситетрагидропириранилового эфира, 1-[(2-хлор-4-метил)фенил]-4-метоксипиперидин-4-ильный эфир, 1-(2-фторфенил)-4-метоксипиперидин-4-ильный эфир, 1,4-диоксан-2-ильный эфир, тетрагидрофураниловый эфир, тетрагидропирираниловый эфир; замещенные этиловые эфиры, как-то 1-этоксидэтиловый эфир, 1-(2-хлорэтоксид)этиловый эфир, 1-[2-(триметилсилил)этоксид]этиловый эфир, 1-метил-1-метоксидэтиловый эфир, 1-метил-1-бензилоксидэтиловый эфир, 1-метил-1-бензилоксид-2-фторэтиловый эфир, 1-метил-1-феноксидэтиловый эфир, 2-триметилсилиловый эфир, трет-бутиловый эфир, аллиловый эфир, пропаргильные эфиры, п-хлорфениловый эфир, п-метоксифениловый эфир, бензиловый эфир, п-метоксибензиловый эфир, 3,4-диметоксибензиловый эфир, триметилсилиловый эфир, триэтилсилиловый эфир, трипропилсилиловый эфир, диметилизопропилсилиловый эфир, диэтилизопропилсилиловый эфир, диметилгексилсилиловый эфир, трет-бутилдиметилсилиловый эфир, дифенилметилсилиловый эфир, сложные эфиры бензоилформиата, ацетата, хлорацетата, дихлорацетата, трихлорацетата, трифторацетата, метоксиацетата, трифенилметоксиацетата, фенилацетата, бензоата, алкилметилкарбонаты, алкил-9-фторфенилметилкарбонаты, алкилэтилкарбонаты, алкил-2,2,2-трихлорэтилкарбонаты, 1,1-диметил-2,2,2-трихлорэтилкарбонаты, алкилсульфонаты, метансульфонаты, бензилсульфонаты, тозилаты, метиленацеталь, этилиденацеталь и трет-бутилметиленкеталь. Предпочтительные защитные группы представлены формулами -R^a, -Si(R^a)(R^a)(R^a), -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)NH(R^a), -S(O)₂R^a, -S(O)₂OH, P(O)(OH) и -P(O)(OH)OR^a, где R^a означает C₁-C₂₀-алкил, C₂-C₂₀-алкенил, C₂-C₂₀-алкинил, -C₁-C₂₀-алкилен(карбоцикл), -C₂-C₂₀-алкенилен(карбоцикл), -C₂-C₂₀-алкинилен(карбоцикл), -C₆-C₁₀-арил, -C₁-C₂₀-алкилен(арил), -C₂-C₂₀-алкенилен(арил), -C₂-C₂₀-алкинилен(арил), -C₁-C₂₀-алкилен(гетероцикл), -C₂-C₂₀-алкенилен(гетероцикл) или -C₂-C₂₀-алкинилен(гетероцикл), при этом радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоциклические и гетероциклические радикалы, сами по себе или в составе другой группы, не обязательно замещены.

"Изменение нативного паттерна гликозилирования" в настоящем изобретении означает удаление одной или нескольких углеводных группировок которые присутствуют в нативной последовательности 158P1D7 (путем удаления исходного сайта гликозилирования либо устранения гликозилирования химическими и/или энзиматическими средствами) и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, отсутствующих у нативной последовательности 158P1D7. Кроме того, это выражение включает качественные изменения в гликозилировании нативных белков, включающие изменение природы и содержания различных углеводных группировок.

Термин "аналог" относится к таким молекулам, которые близки по структуре или имеют близкие или соответствующие атрибуты с другой молекулой (например, родственным 158P1D7 белком). Например, аналог белка 158P1D7 может специфически связываться с такими антителами или Т-клетками, которые специфически связываются с 158P1D7.

Термин "антитело" применяется в самом широком смысле, если явно не указано иначе. При этом "антитело" может быть природным или искусственным типа моноклональных антител, получаемых по стандартной технологии гибридом. Антитела к 158P1D7 включают моноклональные и поликлональные антитела, а также фрагменты, содержащие антиген-связывающий домен и/или один или несколько определяющих комплементарность участков этих антител. В настоящем изобретении термин "антитело" относится к любым формам антител или таким их фрагментам, которые специфически связываются с 158P1D7 и/или проявляют требуемую биологическую активность, а конкретно он охватывает моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, если только они специфически связываются с 158P1D7 и/или проявляют требуемую биологическую активность. В предусмотренных здесь способах и композициях можно использовать любые специфические антитела. Так, в одном воплощении термин "антитело" охватывает молекулы, содержащие по меньшей мере одну переменную область легкой цепи молекулы иммуноглобулина и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которые в сочетании образуют сайт специфического связывания антигена мишени. В одном воплощении антитело представляет собой антитело типа IgG. Например, антитело представляет собой антитело типа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела, применимые в способах и композициях настоящего изобретения, могут быть получены в культуре клеток, в фагах или в различных животных, включая, без ограничения, коров, кроликов, коз, мышей, крыс, хомяков, морских свинок, овец, собак, кошек, обезьян, шимпанзе и человекообразных обезьян. Так, в одном воплощении антитела настоящего изобретения представляют собой антитела млекопитающих. Для выделения исходного антитела или создания вариантов с измененной специфичностью или авидностью могут применяться фаговые методы. Такие методы являются стандартными и хорошо известны в данной области. В одном воплощении антитела получают рекомбинантными методами, известными в данной области. Например, рекомбинантное антитело может быть получено путем трансфекции клеток хозяина вектором, содержащим последовательность ДНК, кодирующую антитело. Для трансфекции последовательности ДНК, экспрессирующей по меньшей мере одну область V_L и одну область V_H в клетках хозяина, можно использовать один или несколько векторов. Примеры описания рекомбинантных способов создания и получения 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, последние издания). Для повышения эффективности антител при выполнении требуемой функции антитела настоящего изобретения могут быть модифицированы рекомбинантными способами. Так, в объем изобретения входит то, что антитела можно модифицировать рекомбинантными способами путем замены. Как правило, замены должны быть консервативными. Например, можно заменить по меньшей мере одну аминокислоту в константной области антитела другим остатком. Например, см. U.S. Patent No. 5,624,821, U.S. Patent No. 6,194,551, Application No. WO 9958572; и Angal et al., *Mol. Immunol.* 30: 105-08 (1993). Модификации аминокислот включают делеции, вставки и замены аминокислот. В некоторых случаях такие изменения производятся для снижения нежелательной активности, например, комплемент-зависимой цитотоксичности. Зачастую антитела метят путем присоединения, ковалентно либо нековалентно, вещества, издающего детектируемый сигнал. Известно большое число меток и методов конъюгирования, которые широко представлены в научной и патентной литературе. Эти антитела могут быть подвергнуты скринингу на связывание с нормальным или дефектным 158P1D7. Например, см. *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Oxford University Press, 1996). Подходящие антитела с требуемой биологической активностью можно идентифицировать следующими методами анализа *in vitro*, включая, без ограничения: пролиферацию, миграцию, адгезию, рост на мягком агаре, ангиогенез, межклеточную коммуникацию, апоптоз, транспорт, передачу сигналов, и такими методами анализа *in vivo*, как ингибирование роста опухолей. Предусмотренные здесь антитела также могут быть полезными для диагностического применения. В качестве захватывающих или не-нейтрализующих антител их можно подвергать скринингу на способность связываться с антигеном без ингибирования рецепторного связывания или биологической активности антигена. В качестве нейтрализующих антител они могут быть полезными в методах анализа конкурентного связывания. Они также могут применяться для количественной оценки 158P1D7 или его рецептора.

Термин "антиген-связывающая часть" или "фрагмент антитела" (или же просто "часть антитела") в настоящем изобретении относится к одному или нескольким фрагментам антител к 158P1D7, сохраняющим способность к специфическому связыванию с антигеном (например, 158P1D7 и его вариантами; фиг. 1). Было показано, что антиген-связывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антиген-связывающая часть" антитела, включают: (i) Fab-фрагмент - моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент - бивалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента,

соединенных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_H1 ; (IV) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенные участки, определяющие комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно соединить рекомбинантными методами при помощи синтетического линкера, позволяющего получать их в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H объединяются с образованием моновалентной молекулы (известной как одноцепочечный Fv (scFv); например, см. Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела тоже охватываются термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела. Такие фрагменты антител получают стандартными методами, известными специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу на применимость таким же образом, как и интактные антитела.

В настоящем изобретении для получения антител, специфичных к 158P1D7, могут использоваться любые формы "антигена". Так, индуцирующим антигеном может быть единственный эпитоп, множественный эпитоп или весь белок сам по себе или в комбинации с одним или несколькими усиливающими иммуногенность средствами, известными в данной области. Индуцирующим антигеном может быть полноразмерный белок, белок клеточной поверхности (например, при иммунизации с помощью клеток, трансфицированных, по меньшей мере, частью антигена) или растворимый белок (например, при иммунизации только частью внеклеточного домена белка). Антиген может быть получен в генетически модифицированных клетках. Кодирующая антиген ДНК может быть геномной или не геномной (например, кДНК) и кодировать, по меньшей мере, часть внеклеточного домена. В настоящем изобретении термин "часть" относится к минимальному числу аминокислот или нуклеиновых кислот, как подойдет, составляющих иммуногенный эпитоп данного антигена. Для трансформации нужных клеток могут использоваться любые подходящие генетические векторы, в том числе, но без ограничения, аденовирусные векторы, плазмиды и невирусные векторы, как-то катионные липиды. В одном воплощении антитело в приведенных здесь способах и композициях специфически связывается, по меньшей мере, с частью внеклеточного домена данного 158P1D7.

Представленные здесь антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с "биологически активным веществом". В настоящем изобретении термин "биоактивное вещество" относится к любым синтетическим или природным соединениям, которые связываются с антигеном и/или усиливают либо опосредуют требуемый биологический эффект для усиления уничтожения клеток токсинами. В одном воплощении связывающие фрагменты, применимые в настоящем изобретении, являются биологически активными фрагментами. В настоящем изобретении термин "биологически активный" относится к таким антителам или фрагментам антител, которые способны связываться с требуемым антигенным эпитопом и прямо или косвенно оказывать биологическое действие. Прямые эффекты включают, без ограничения, модулирование, стимулирование и/или ингибирование ростового сигнала, модулирование, стимулирование и/или ингибирование антиапоптозного сигнала, модулирование, стимулирование и/или ингибирование сигнала апоптозного или некротического сигнала, модулирование, стимулирование и/или ингибирование каскада ADCC и модулирование, стимулирование и/или ингибирование каскада CDC.

В способах и композициях настоящего изобретения также могут использоваться "биспецифичные антитела". В настоящем изобретении термин "биспецифичное антитело" относится к таким антителам, как правило, моноклональным антителам, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере к двум различным антигенным эпитопам. В одном воплощении эпитопы относятся к одному и тому же антигену. В другом воплощении эпитопы относятся к двум разным антигенам. Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. Например, биспецифичные антитела могут быть получены рекомбинантным способом при совместной экспрессии двух пар тяжелых цепей/легких цепей иммуноглобулинов. Например, см. Milstein et al., *Nature* 305:537-39 (1983). Кроме того, биспецифичные антитела могут быть получены путем химического связывания. Например, см. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985). Биспецифичные антитела включают и фрагменты биспецифичных антител. Например, см. Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993); Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Описанные здесь моноклональные антитела конкретно включают "химерные" антитела, у которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям у антител, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям у антител, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если только они специфически связываются с антигеном мишени и/или проявляют требуемую биологическую активность (U.S. Pat. No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

Термин "химиотерапевтическое средство" относится ко всем химическим соединениям, эффективно ингибирующим рост опухолей. Неограничительные примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, к примеру, азотные производные иприта, этилениминовые соединения и алкилсульфонаты; антиметаболиты, к примеру, антагонисты фолиевой кислоты, пуринов или пиримидинов;

ингибиторы митоза, к примеру, антитубулиновые средства, как-то алкалоиды барвинка, ауристатин и производные подофиллотоксина; цитотоксические антибиотики; соединения, которые повреждают или нарушают экспрессию или репликацию ДНК, к примеру, связывающиеся с малой бороздкой ДНК; и антагонисты рецепторов фактора роста. Кроме того, химиотерапевтические средства включают цитотоксические средства (как определено здесь), антитела, биологические молекулы и небольшие молекулы.

Термин "соединение" означает и охватывает само химическое соединение, а также, будь то заявлено прямо или нет и если из контекста не ясно, что это нужно исключить, следующее: аморфные и кристаллические формы соединения, в том числе полиморфные формы, причем эти формы могут быть частью смеси или по отдельности; соединения в виде свободной кислоты и свободного основания, которые обычно представлены в приведенных здесь структурах; изомеры соединения, к которым относятся оптические изомеры и таутомерные изомеры, причем оптические изомеры включают энантиомеры и диастереомеры, хиральные изомеры и нехиральные изомеры, а оптические изомеры включают отдельные оптические изомеры, а также смеси оптических изомеров, включая рацемические и нерацемические смеси, в которых изомер может быть в выделенном виде или в смеси с одним или несколькими другими изомерами; изотопы соединения, в том числе соединения, содержащие дейтерий и тритий, а также соединения, содержащие радиоизотопы, в том числе терапевтически и диагностически эффективные радиоизотопы; мультимерные формы соединения, в том числе димерные, тримерные и пр. формы; соли соединения, предпочтительно фармацевтически приемлемые соли, в том числе соли с кислотами и соли с основаниями, в том числе соли с органическими противоионами и неорганическими противоионами, включая цвиттерионные формы; при этом, если соединение связано с двумя или несколькими противоионами, то эти два или несколько противоионов могут быть одинаковыми или разными; и сольваты соединения, в том числе гемисольваты, монотригидраты, дисольваты и пр., включая органические сольваты и неорганические сольваты, причем неорганические сольваты включают гидраты; при этом, если соединение связано с молекулами двух или нескольких растворителей, то эти молекулы двух или нескольких растворителей могут быть одинаковыми или разными. В некоторых случаях приведенные здесь ссылки на соединения по изобретению включают прямые ссылки на одну или несколько из вышеуказанных форм, например на соли и/или сольваты, однако такие ссылки приводятся только для того, чтобы особо выделить некие формы и не должны восприниматься как исключающие другие из указанных форм, приведенных выше.

Термины "определяющий комплементарность участок" и "CDR" известны в данной области и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антител, которые придают специфичность к антигенам и сродство связывания. В общем, есть три (3) CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три (3) CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3).

Точные границы аминокислотной последовательности данного CDR можно легко определить по любой из целого ряда хорошо известных схем, в том числе тех, что описаны в Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации "Kabat"), Al-Lazikani et al. (1997) JMB 273, 927-948 (система нумерации "Chothia"), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745" (система нумерации "Contact"), Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77 (система нумерации "IMGT"), и Honegger A. and Plückthun A. "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J. Mol. Biol., 2001, 309(3):657-70 (система нумерации AHO).

Границы данного CDR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация по обеим схемам Kabat и Chothia основывается на самых распространенных длинах последовательностей участков антител, при этом у некоторых антител появляются вставки, которые обозначаются буквами, к примеру, "30a", и делеции. В этих двух схемах определенные вставки и делеции ("indels") располагаются в разных положениях, что приводит к различной нумерации. Схема Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом сходна со схемой нумерации Chothia. Ниже в табл. V перечислены те положения в CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, которые определены по схеме Kabat, Chothia и Contact, соответственно. Для CDR-H1 приводится нумерация остатков по системе нумерации и Kabat, и Chothia.

Таким образом, если не указано иначе, термины "CDR" и "определяющий комплементарность участок" данного антитела или его области типа вариабельной области, а также индивидуальных CDR (например, CDR-H1, CDR-H2) антитела или его области должны охватывать определяющие комплементарность участки, определенные по любой из известных схем, описанных выше. В некоторых случаях приводится схема идентификации определенных CDR, как-то CDR при определении по методу Kabat, Chothia или Contact. В других случаях приводится аминокислотная последовательность данного CDR.

В настоящем изобретении термин "консервативная замена" относится к таким заменам аминокислот, известным специалистам в данной области, которые обычно происходят без изменения биологиче-

ской активности полученной молекулы. Специалистам известно, что одиночные аминокислотные замены в несущественных участках полипептида обычно практически не изменяют биологическую активность (например, см. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Такие типичные замены предпочтительно делаются в соответствии с приведенными в табл. II и табл. III(a-b). Например, такие замены включают замены любого из изолейцина (I), валина (V) и лейцина (L) на любую другую из этих гидрофобных аминокислот; аспарагиновой кислоты (D) на глутаминовую кислоту (E) и наоборот; глутамин (Q) на аспарагин (N) и наоборот; и серина (S) на треонин (T) и наоборот. Другие замены также могут считаться консервативными, в зависимости от окружения данной аминокислоты и ее роли в трехмерной структуре белка. Например, глицин (G) и аланин (A) часто бывают взаимозаменяемыми, как и аланин (A) и валин (V). Метионин (M), который относительно гидрофобен, часто бывает взаимозаменяемым с лейцином и изолейцином, а иногда и с валином. Лизин (K) и аргинин (R) часто взаимозаменяемы в тех местах, в которых важной характеристикой аминокислотного остатка является его заряд, а различия по pK 's этих двух аминокислотных остатков несущественны. Также и другие изменения можно считать "консервативными" в определенном окружении (например, см. приведенную здесь табл. III(a); стр. 13-15 в "Biochemistry" 2nd ed., Lubert Stryer, ed. (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992, 89: 10915-10919; Lei et al., J. Biol. Chem. 1995, 270(20): 11882-6). Допустимы и другие замены, которые можно определить эмпирически или в соответствии с известными консервативными заменами.

Термин "цитотоксическое средство" относится к таким веществам, которые ингибируют или предотвращают экспрессирующую активность клеток, функцию клеток и/или вызывают разрушение клеток. Этот термин охватывает радиоактивные изотопы, химиотерапевтические средства и такие токсины, как низкомолекулярные токсины или энзиматически активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты. Примеры цитотоксических средств включают, без ограничения, ауристатин (например, ауристатин E, ауристатин F, MMAE и MMAF), аурамицины, майтансиноиды, рицин, цепь А рицина, комбрестатин, дуокармицины, доластатин, доксорубин, даунорубин, таксол, цисплатин, сс1065, этидия бромид, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, дигидроксиантрицидин, актиномицин, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas* (PE), PE40, абрин, цепь А абрина, цепь А модекина, альфа-сарцин, гелонин, митогеллин, ретстриктоцин, феномицин, эномицин, курицин, кротин, калихеамицин, ингибитор *Saponaia officinalis*, глюкокортикоиды и другие химиотерапевтические средства, а также радиоактивные изотопы, такие как At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} или Bi^{213} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu, включая Lu^{177} . Антитела также могут быть конъюгированы с ферментом, активирующим противораковые пролекарства, способным превращать пролекарство в его активную форму.

В настоящем изобретении термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антиген-связывающими сайтами, причем эти фрагменты содержат варибельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с варибельным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L). При помощи линкера, слишком короткого для спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи, домены будут вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта. Диатела более подробно описаны, например, в EP 404,097; WO 93/11161; и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

Термин "истощать" в контексте влияния 158P1D7-связывающего средства на 158P1D7-экспрессирующие клетки означает уменьшение количества или устранение 158P1D7-экспрессирующих клеток.

Термин "генный продукт" в настоящем изобретении означает пептид/белок или мРНК. Например, "генный продукт по изобретению" иногда именуется как "раковая аминокислотная последовательность", "раковый белок", "белок ракового заболевания, приведенного в табл. I", "раковая мРНК", "мРНК ракового заболевания, приведенного в табл. I" и т.д. В одном воплощении раковый белок кодируется нуклеиновой кислотой из фиг. 1. Раковым белком может быть фрагмент или же полноразмерный белок, кодируемый нуклеиновыми кислотами из фиг. 1. В одном воплощении раковая аминокислотная последовательность применяется для определения идентичности или сходства последовательности. В другом воплощении эти последовательности являются природными аллельными вариантами белка, кодируемого нуклеиновой кислотой из фиг. 1. В другом воплощении эти последовательности являются вариантами описанных далее последовательностей.

В способах и композициях настоящего изобретения могут применяться "гетероконъюгатные" антитела. В настоящем изобретении термин "гетероконъюгатное антитело" относится к двум соединенным ковалентно антителам. Такие антитела могут быть получены известными в белковой химии методами синтеза, в том числе с использованием сшивающих реагентов. Например, см. U.S. Patent No. 4,676,980.

Термин "гомолог" относится к молекулам, проявляющим гомологию с другой молекулой, к примеру, по наличию в последовательности одинаковых или аналогичных химических остатков в соответствующих положениях.

В одном воплощении представленные здесь антитела являются "человеческими антителами". В настоящем изобретении термин "человеческое антитело" относится к таким антителам, у которых практи-

чески все последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи, в том числе участки, определяющие комплементарность (CDR), происходят из генов человека. В одном воплощении человеческие моноклональные антитела получают трионным методом, методом В-клеток человека (например, см. Kozbor et al., *Immunol. Today* 4: 72 (1983), методом трансформации EBV (например, см. Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77-96 (1985)) или методом фагового дисплея (например, см. Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)). В предпочтительном воплощении человеческие антитела вырабатываются у трансгенных мышей. Способы получения таких частично или полностью человеческих антител известны в данной области, причем можно использовать любые такие способы. В соответствии с одним особенно предпочтительным воплощением, последовательности полностью человеческих антител получают у трансгенных мышей, подвергнутых инженерии для экспрессии генов тяжелой и легкой цепей антител человека. Типичное описание получения трансгенных мышей, вырабатывающих человеческие антитела, и их потомства, приведено в заявке WO 02/43478 и United States Patent 6,657,103 (Abgenix). Затем проводится слияние В-клеток из трансгенных мышей, вырабатывающих требуемое антитело, получающая гибридомные линии клеток для непрерывной продукции антител. Например, см. U.S. Patent Nos. 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; и 5,545,806; и Jakobovits, *Adv. Drug Del. Rev.* 31:33-42 (1998); Green et al., *J. Exp. Med.* 188:483-95 (1998).

В настоящем изобретении термин "гуманизированное антитело" относится к таким формам антител, которые содержат последовательности из антител не человека (например, мыши), а также из антител человека. Такие антитела являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не человека. В общем, гуманизированное антитело должно содержать практически все из по меньшей мере одного, обычно из двух переменных доменов, у которых все или практически все гиперпеременные петли соответствуют таковым из нечеловеческого иммуноглобулина, а все или практически все каркасные участки (FR) происходят из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также должно содержать, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Например, см. Cabilly, U.S. Patent No. 4,816,567; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; и *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Oxford University Press, 1996).

Термины "ингибировать" или "ингибирование" в настоящем описании означают уменьшение на измеримое количество или полное предотвращение.

Выражения "выделенный" или "биологически чистый" относятся к таким материалам, которые практически или в основном свободны от компонентов, обычно сопровождающих этот материал в его природном состоянии. Так, выделенные пептиды по изобретению предпочтительно не содержат материалов, обычно связанных с пептидами в их окружении *in situ*. Например, полинуклеотид называется "выделенным", если он существенно отделен от загрязняющих полинуклеотидов, соответствующих или комплементарных другим генам, чем 158P1D7, или кодирующих другие полипептиды, чем продукты гена 158P1D7 или его фрагментов. Специалисты легко смогут использовать процедуры выделения нуклеиновых кислот для получения выделенного полинуклеотида 158P1D7. Белок называется "выделенным", к примеру, если для отделения белка 158P1D7 от клеточных компонентов, обычно связанных с ним, применяются физические, механические или химические методы. Специалисты легко смогут использовать стандартные методы очистки для получения выделенного белка 158P1D7. В качестве альтернативы, выделенный белок может быть получен химическим способом.

Подходящие "метки" включают радионуклиды, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, магнитные частицы и пр. Применение таких меток изложено в патентах U.S. Patent Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; и 4,366,241. Кроме того, представленные здесь антитела могут применяться в качестве антиген-связывающего компонента флуоротел. Например, см. Zeytun et al., *Nat. Biotechnol.* 21:1473-79 (2003).

Термин "млекопитающее" относится к любым организмам, классифицированным как млекопитающие, в том числе мышам, крысам, кроликам, собакам, кошкам, коровам, лошадям и людям. В одном воплощении изобретения млекопитающее представлено мышами. В другом воплощении изобретения млекопитающее представлено человеком.

Термины "метастазирующий рак" и "метастатическое заболевание" означают такие раковые заболевания, которые распространились в регионарные лимфатические узлы или в отдаленные места и охватывают стадию D заболевания по системе AUA и стадию T_xN_xM⁺ по системе TNM.

Термины "модулятор" или "исследуемое соединение" или "лекарство-кандидат" или используемые здесь грамматические эквиваленты описывают любые молекулы, например белки, олигопептиды, небольшие органические молекулы, полисахариды, полинуклеотиды и т.п., которые подлежат тестированию на их способность прямо или косвенно изменять раковый фенотип или экспрессию раковых последовательностей, например, последовательностей нуклеиновых кислот или белков, либо эффекты раковых последовательностей (например, сигнализацию, экспрессию генов, взаимодействие белков и т.д.). В одном аспекте модулятор нейтрализует эффект ракового белка по изобретению. Под "нейтрализацией" понимается ингибирование или блокирование активности белка, наряду с последующим действием на клетки. В другом аспекте модулятор нейтрализует эффект гена и соответствующего ему белка по изобре-

тению путем нормализации уровня данного белка. В предпочтительных воплощениях модуляторы изменяют профили экспрессии представленных здесь нуклеиновых кислот или белков либо нижележащие эффекторные пути. В одном воплощении модулятор подавляет раковый фенотип, например, до нормального "отпечатка" ткани. В другом воплощении модулятор индуцирует раковый фенотип. Как правило, проводится анализ нескольких смесей параллельно с различными концентрациями вещества, чтобы получить дифференциальные ответы при различных концентрациях. Как правило, одна из этих концентраций служит в качестве отрицательного контроля, т.е. при нулевой концентрации или ниже уровня обнаружения.

Модуляторы, лекарства-кандидаты или исследуемые соединения охватывают различные химические классы, хотя, как правило, это органические молекулы, предпочтительно небольшие органические соединения с молекулярной массой более 100 и менее 2500 дальтон. Предпочтительны небольшие молекулы с молекулярной массой менее 2000 или менее 1500 или менее 1000 или менее 500 Д. Лекарства-кандидаты содержат функциональные группы, необходимые для структурного взаимодействия с белками, в частности, для образования водородных связей, и обычно содержат по меньшей мере одну аминокислотную, карбонильную, гидроксильную или карбоксильную группу, предпочтительно по меньшей мере две функциональные химические группы. Лекарства-кандидаты часто содержат циклические углеродные или гетероциклические структуры и/или ароматические или полиароматические структуры, замещенные одной или несколькими из вышеуказанных функциональных групп. Модуляторы также включают такие биомолекулы, как пептиды, сахараиды, жирные кислоты, стероиды, пурины, пиримидины, их производные, структурные аналоги или комбинации. Особенно предпочтительными являются пептиды. Один класс модуляторов составляют пептиды, к примеру, длиной от 5 до 35 аминокислот, предпочтительно от 5 до 20 аминокислот и особенно предпочтительно от 7 до 15. Предпочтительно модулирующий рак белок является растворимым, включает в себя нетрансмембранную область и/или содержит N-концевой Cys, способствующий растворимости. В одном воплощении у фрагмента C-конец содержится в виде свободной кислоты, а N-конец представляет собой свободный амин, что способствует присоединению, например, к цистеину. В одном воплощении раковый белок по изобретению конъюгирован с иммуногенным средством, как изложено здесь. В одном воплощении раковый белок конъюгирован с BSA. Пептиды по изобретению, к примеру, предпочтительной длины, могут соединяться друг с другом или с другими аминокислотами с образованием более длинного пептида/белка. Модуляторные пептиды могут быть расщепленными природными белками, как изложено выше, случайными пептидами или "смещенными" случайными пептидами. В предпочтительном воплощении модуляторы на основе пептидов/белков представлены антителами и их фрагментами, как определено здесь.

Термин "моноклональное антитело" в настоящем изобретении относится к антителам, полученным из популяции практически однородных антител, т.е. составляющие популяцию индивидуальные антитела являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительном количестве. Моноклональные антитела высоко специфичны, так как они направлены против одного антигенного эпитопа. Напротив, препараты обычных (поликлональных) антител, как правило, включают в себя множество антител, направленных против (или специфичных к) различным эпитопам. В одном воплощении поликлональные антитела содержат множество моноклональных антител с различной специфичностью к эпитопам, сродством или авидностью в рамках одного антигена, содержащего несколько антигенных эпитопов. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител, и не должно восприниматься так, как будто для получения антитела требуется какой-то конкретный способ. Например, моноклональные антитела для применения по настоящему изобретению могут быть получены методом гибридом, впервые описанным Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), или же методами рекомбинантной ДНК (например, см. U.S. Pat. No. 4,816,567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с помощью методов, описанных, к примеру, в Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991). Такие моноклональные антитела обычно связываются с Kd по меньшей мере 1 мкМ, чаще по меньшей мере 300 нМ, типично по меньшей мере 30 нМ, предпочтительно по меньшей мере 10 нМ, более предпочтительно по меньшей мере 3 нМ или лучше, как правило, при определении методом ELISA.

"Фармацевтические эксципиенты" включают такие материалы, как адъюванты, носители, pH-регулирующие и буферные вещества, поддерживающие изотоничность вещества, смачивающие вещества, консерванты и др.

"Фармацевтически приемлемый" относится к нетоксичным, инертным и/или таким композициям, которые физиологически совместимы с человеком или другими млекопитающими.

Термин "полинуклеотид" означает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере в 10 оснований или пар оснований, будь то рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды или модифицированные формы любого типа нуклеотидов, и охватывает одно- и двухцепочечные формы ДНК и/или РНК. В данной области этот термин часто применяется взаимозаменяемо с "олигонуклеотидом". Полинуклеотид может включать приведенную здесь последовательность нуклеотидов, в которой может быть и тимин (Т), как показано, к примеру, на фиг. 1, и урацил (U); это определение относится к различиям между

химическими структурами ДНК и РНК, в частности, к тому, что одним из четырех основных оснований в РНК является урацил (U) вместо тимидина (T).

Термин "полипептид" означает полимер по меньшей мере из 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот. По всему описанию применяются стандартные трехбуквенные (см. табл. III) или однобуквенные обозначения для аминокислот. В данной области этот термин часто применяется взаимозаменяемо с "пептидом" или "белком".

"Рекомбинантная" молекула ДНК или РНК является такой молекулой ДНК или РНК, которая подвергалась молекулярной манипуляции *in vitro*.

В настоящем изобретении термин "одноцепочечный Fv" или "scFv" или "одноцепочечное" антитело относится к фрагментам антител, содержащим домены V_H и V_L антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , который позволяет scFv образовать требуемую структуру для связывания антигена. См. обзор по scFv: Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore, eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

В настоящем изобретении термины "специфичный", "специфическое связывание" и "специфически связывается" относятся к избирательному связыванию антитела с эпитопом искомого антигена. Антитела можно тестировать на специфичность связывания, сравнивая связывание с соответствующим антигеном со связыванием с посторонним антигеном или смесью антигенов при заданном наборе условий. Если антитело связывается с соответствующим антигеном по меньшей мере в 2, 5, 7 или предпочтительно в 10 раз сильнее, чем с посторонним антигеном или смесью антигенов, то оно считается специфичным. В одном воплощении специфичным является такое антитело, которое связывается только с антигеном 158P1D7, но не связывается с посторонним антигеном. В другом воплощении специфичным является такое антитело, которое связывается с антигеном 158P1D7 человека, но не связывается с антигеном 158P1D7 не человека, причем гомологичность по аминокислотам с антигеном 158P1D7 составляет 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше. В другом воплощении специфичным является такое антитело, которое связывается с антигеном 158P1D7 человека и с антигеном 158P1D7 мыши, но с антигеном человека оно связывается в большей степени. В другом воплощении специфичным является такое антитело, которое связывается с антигеном 158P1D7 человека и с антигеном 158P1D7 приматов, но с антигеном человека оно связывается в большей степени. В другом воплощении специфичное антитело связывается с антигеном 158P1D7 человека и с любым антигеном 158P1D7 не человека, но с антигеном человека или любой его комбинацией оно связывается в большей степени.

В настоящем изобретении термины "лечить" или "лечение" и грамматически родственные термины относятся к любому улучшению каких-либо последствий болезни, как-то увеличению срока выживания, снижению заболеваемости и/или уменьшению побочных эффектов, являющихся побочными продуктами альтернативного способа лечения; как это хорошо известно в данной области, полное искоренение заболевания является предпочтительным, хотя и не обязательным требованием для самого лечения.

Термин "вариант" относится к таким молекулам, которые проявляют отклонения от описанного типа или нормы, как-то белкам, содержащим один или несколько различных аминокислотных остатков в соответствующих положениях описанного конкретного белка (например, белка 158P1D7, приведенного на фиг. 1). Примером варианта белка является аналог. Другими примерами вариантов являются сплайс-изоформы и полиморфизмы по отдельным нуклеотидам (SNP).

"Белки 158P1D7" и/или "родственные 158P1D7 белки" по изобретению включают белки, конкретно определенные здесь (см. фиг. 1), а также их аллельные варианты, варианты с консервативными заменами, аналоги и гомологи, которые могут быть выделены/получены и охарактеризованы без излишнего экспериментирования, следуя описанным здесь методам, или же легко доступны в данной области. Также включены слитые белки, в которых сочетаются части различных белков 158P1D7 или их фрагментов, а также слитые белки из белка 158P1D7 и гетерологичных полипептидов. Такие белки 158P1D7 собирательно именуются родственными 158P1D7 белками, белками по изобретению или 158P1D7. Термин "родственный 158P1D7 белок" относится к полипептидным фрагментам или последовательностям белка 158P1D7 длиной в 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более 25 аминокислот; либо 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, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 830, 835, 840, 841 или больше аминокислот.

II. Антитела к 158P1D7.

В другом аспекте изобретения предусмотрены антитела, которые связываются с родственными 158P1D7 белками (см. фиг. 1). В одном воплощении антитело, которое связывается с родственными 158P1D7 белками, представляет собой антитело, которое специфически связывается с белком 158P1D7, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Антитела, которые специфически связываются с белком 158P1D7, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, включают антитела, которые могут связываться и с другими родственными 158P1D7 белками. Например, антитела, которые связываются с белком 158P1D7, содержащим аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 2, могут связываться с такими родственными 158P1D7 белками, как варианты 158P1D7 и их гомологи или аналоги.

Антитела к 158P1D7 по изобретению особенно полезны при прогнозировании раковых заболеваний (например, см. табл. I), интраскопии, в диагностических и терапевтических. Кроме того, такие антитела применимы при лечении и/или прогнозировании рака мочевого пузыря и других раковых заболеваний, постольку, поскольку 158P1D7 также экспрессируется или избыточно экспрессируется при этих других раковых заболеваниях. Кроме того, антитела к 158P1D7 по изобретению терапевтически полезны для лечения таких раковых заболеваний, при которых задействована экспрессия 158P1D7, особенно рака мочевого пузыря типа запущенного или метастатического рака мочевого пузыря, если эти антитела конъюгированы с описанным здесь монометилауристатином E (MMAE).

Хорошо известны различные способы получения антител, в особенности моноклональных антител. Например, антитела могут быть получены путем иммунизации подходящего млекопитающего хозяина с помощью родственного 158P1D7 белка, пептида или фрагмента, в выделенном или иммуноконъюгированном виде (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Кроме того, также можно использовать и слитые белки 158P1D7 типа слитого с GST белка 158P1D7. В предпочтительном воплощении получают слитый с GST белок, включающий всю или большую часть аминокислотной последовательности из фиг. 1, а затем используют его в качестве иммуногена для вырабатывания соответствующих антител. В другом воплощении синтезируют родственный 158P1D7 белок и используют его в качестве иммуногена.

Кроме того, применяются известные в данной области методики иммунизации с помощью голых ДНК (вместе с или без очищенного родственного 158P1D7 белка или экспрессирующих 158P1D7 клеток), чтобы вызвать иммунный ответ на кодируемый иммуноген (см. обзор Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

Для отбора конкретных участков белка 158P1D7 для получения антител можно проанализировать аминокислотную последовательность белка 158P1D7, представленную на фиг. 1. Например, для идентификации гидрофильных участков в структуре 158P1D7 применяется анализ гидрофобности и гидрофильности последовательности аминокислот 158P1D7. Участки белка 158P1D7, проявляющие иммуногенную структуру, а также и другие участки и домены, можно легко идентифицировать с помощью различных других методов, известных в данной области, таких как анализ Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz или Jameson-Wolf. Профили гидрофильности можно получить по методу Hopp T.P. and Woods K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828. Профили гидрофобности можно получить по методу Kyte J. and Doolittle R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132. Профили степени доступности остатков в процентах (%) можно получить по методу Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Усредненные профили гибкости можно получить по методу Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Профили бета-складок можно получить по методу Deleage G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. При этом каждый участок, идентифицированный по любой из этих программ или методов, входит в объем настоящего изобретения. Предпочтительные способы получения антител к 158P1D7 дополнительно раскрыты на приведенных здесь примерах. Методы получения белка или полипептида для применения в качестве иммуногена хорошо известны в данной области. Также хорошо известны методы получения иммуногенных конъюгатов белка с таким носителем, как BSA, KLH или с другим белком-носителем. В некоторых случаях применяется прямое конъюгирование, например, с помощью карбодиимидных реагентов; в других случаях эффективными являются связывающие реагенты типа тех, что поставляются Pierce Chemical Co., Rockford, IL. Введение иммуногена 158P1D7 часто проводится путем инъекции на протяжении соответствующего периода времени и с использованием подходящего адъюванта, как это предусмотрено в данной области. Адекватность образования антител во время иммунизации можно определять по титрам антител.

Моноклональные антитела к 158P1D7 можно получить различными способами, хорошо известными в данной области. Например, получают линию immortalized клеток, секретирующих требуемые моноклональные антитела, по стандартной гибридомной технологии Kohler and Milstein или по модификациям, в которых получают immortalized В-клетки, вырабатывающие антитела, как это известно вообще.

Клетки immortalized линий, секретирующих требуемые антитела, подвергают скринингу при помощи иммуоферментного анализа, в котором антигеном служит родственный 158P1D7 белок. Когда соответствующая культура immortalized клеток идентифицирована, то клетки можно размножить и получать антитела из культур *in vitro* либо из асцитной жидкости.

Антитела или фрагменты по изобретению также можно получить рекомбинантными способами. Участки, которые специфически связываются с требуемыми участками белка 158P1D7, также можно получить в контексте химерных антител или антител с пересаженными участками, определяющими комплементарность (CDR), из других видов. Также можно получить гуманизированные или человеческие антитела к 158P1D7, которые предпочтительны для применения в терапевтическом контексте. Хорошо известны способы гуманизации мышиных и других антител не человека путем вставки одного или нескольких CDR из антитела не человека вместо соответствующих последовательностей антител человека

(например, см. Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536). Также см. Carter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 и Sims et al., 1993, J. Immunol. 151: 2296.

В предпочтительном воплощении антитела настоящего изобретения включают полностью человеческие антитела к 158P1D7 (mAbs к 158P1D7). Предусмотрены различные способы получения полностью человеческих mAbs к 158P1D7. Например, в предпочтительном воплощении предусмотрены методы с использованием трансгенных мышей, инактивированных по выработке антител, которым встроены локусы тяжелых и легких цепей человека и которые именуются XenoMouse (Amgen Fremont, Inc.). Типичное описание получения трансгенных мышей, вырабатывающих антитела человека, приведено в U.S. 6,657,103. Также см. U.S. Patent Nos. 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; и 5,545,806; и 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 по изобретению можно получить с помощью мышей HuMAb (Medarex, Inc.), которые содержат минилокусы генов иммуноглобулина человека, кодирующие неперестроенные последовательности тяжелых (мю- и гамма-) и легких каппа-цепей иммуноглобулина человека вместе с направленными мутациями, инактивирующими эндогенные локусы мю- и каппа-цепей (например, см. Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859).

В другом воплощении полностью человеческие антитела по изобретению можно получить с помощью мышей, несущих последовательности иммуноглобулинов человека на трансгенах и трансхромосомах, как-то мышей, несущих трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши именуются здесь как "мыши KM", которые описаны в Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 и PCT Publication WO 02/43478 на Tomizuka et al.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению также можно получить методами фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие методы фагового дисплея для выделения антител человека признаны в данной области. Например, см. U.S. Pat. Nos. 5,223,409; 5,403,484; и 5,571,698 на Ladner et al.; U.S. Pat. Nos. 5,427,908 и 5,580,717 на Dower et al.; U.S. Pat. Nos. 5,969,108 и 6,172,197 на McCafferty et al.; и U.S. Pat. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 и 6,593,081 на Griffiths et al.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению также можно получить с помощью мышей SCID, у которых были воссозданы иммунные клетки человека таким образом, что после иммунизации могут вырабатываться человеческие антитела. Такие мыши описаны, к примеру, в U.S. Pat. Nos. 5,476,996 и 5,698,767 на Wilson et al.

Человеческие моноклональные антитела по изобретению также можно получить с помощью мышей, у которых геномные последовательности, несущие эндогенные вариабельные сегменты мыши в локусах тяжелой цепи иммуноглобулина (сегменты V_H, D_H, J_H) и/или легкой каппа-цепи (V_K и J_K) были заменены, полностью или частично, на геномные последовательности человека, несущие неперестроенные гаметные вариабельные сегменты локусов тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H, D_H и J_H) и/или легкой каппа-цепи (V_K и J_K) человека (Regeneron, Tarrytown, NY). Например, см. U.S. Patent Nos. 6,586,251, 6,596,541, 7,105,348, 6,528,313, 6,638,768 и 6,528,314.

В одном воплощении mAbs к 158P1D7 по изобретению включают вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного Ha15-10ac12, которое вырабатывается в клетках яичников китайского хомячка (CHO), депонированных в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа РТА-13102 (см. фиг. 3), или вариабельные областей тяжелой и легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, гомологичные аминокислотным последовательностям вариабельных областей тяжелой и легкой цепи Ha15-10ac12, типа их функциональных фрагментов, причем эти антитела сохраняют требуемые функциональные свойства mAbs к 158P1D7 по изобретению. Вариабельная область тяжелой цепи Ha15-10ac12 имеет аминокислотную последовательность в пределах от 1-го остатка Q до 120-го остатка S в SEQ ID NO: 7, а вариабельная область легкой цепи Ha15-10ac12 имеет аминокислотную последовательность в пределах от 1-го остатка D до 113-го остатка R в SEQ ID NO: 8.

В одном воплощении антитело к 158P1D7 содержит CDR тяжелой цепи из вариабельной области тяжелой цепи Ha15-10ac12, как-то CDR 1, 2 и/или 3 тяжелой цепи из вариабельной области тяжелой цепи Ha15-10ac12, например CDR1, CDR2 и/или CDR3 из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, при определении по любой известной схеме нумерации для идентификации CDR, как-то любой из описанных здесь. В одном воплощении антитело к 158P1D7 содержит CDR легкой цепи из вариабельной области легкой цепи Ha15-10ac12, как-то CDR 1, 2 и/или 3 легкой цепи из вариабельной области легкой цепи Ha15-10ac12, например CDR1, CDR2 и/или CDR3 из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7, при определении по любой известной схеме нумерации для идентификации CDR, как-то любой из описанных здесь. В одном аспекте участки CDR 1-3 из вариабельной области тяжелой цепи Ha15-10ac12 содержат аминокислотные последовательности в пределах остатков 31-35, остатков 50-66 и остатков 99-109, соответственно, из SEQ ID NO: 7. В другом аспекте участки CDR 1-3 из вариабельной области легкой цепи Ha15-10ac12 содержат аминокислотные последовательности в пределах остатков 24-39, остатков 55-61 и остатков 94-102, соответственно, из SEQ ID

NO: 8. Таким образом, в некоторых аспектах антитело к 158P1D7 содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий остатки 31-35 из SEQ ID NO: 7, CDR2 тяжелой цепи, содержащий остатки 50-66 из SEQ ID NO: 7, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий остатки 99-109 из SEQ ID NO: 7, и/или CDR1 легкой цепи, содержащий остатки 24-39 из SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи, содержащий остатки 55-61 из SEQ ID NO: 8 и/или CDR3 легкой цепи, содержащий остатки 94-102 из SEQ ID NO: 8. Также среди представленных воплощений имеются антитела, конкурирующие за связывание с антигеном с антителами, имеющими такие последовательности варибельной области и/или CDR. В некоторых воплощениях представленное антитело включает константную область. Константная область может быть из любого подкласса константной области. В одном воплощении в качестве константной области тяжелой цепи используется константная область IgG2 человека, а в качестве константной области легкой цепи - константная область каппа-цепи Ig.

Например, изобретением предусмотрено выделенное моноклональное антитело либо его антиген-связывающая часть, включающие варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, причем:

(a) варибельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, приведенной на фиг. 3; и

(b) варибельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, приведенной на фиг. 3.

В других воплощениях 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 , приведенным на фиг. 3.

В другом воплощении изобретением предусмотрено выделенное моноклональное антитело либо его антиген-связывающая часть, включающие гуманизированную варибельную область тяжелой цепи и гуманизированную варибельную область легкой цепи, причем:

(a) варибельная область тяжелой цепи включает один, два, или три определяющих комплементарность участка (CDR), имеющих аминокислотные последовательности участков CDR 1, 2 и/или 3 из варибельной области тяжелой цепи, приведенной на фиг. 3, при определении по любой известной схеме нумерации, как-то любой из описанных здесь;

(b) варибельная область легкой цепи включает один, два, или три участка CDR, имеющих аминокислотные последовательности участков CDR 1, 2 и/или 3 из варибельной области легкой цепи, приведенной на фиг. 3, при определении по любой известной схеме нумерации, как-то любой из описанных здесь.

В другом воплощении антитело или его антиген-связывающая часть конкурирует за связывание с антителами, имеющими такие участки CDR тяжелой и/или легкой цепи.

Сконструированные антитела по изобретению включают такие, у которых были сделаны изменения в каркасных остатках V_H и/или V_L (например, для улучшения свойств антител). Как правило, такие модификации каркаса делаются для снижения иммуногенности антител. Например, один подход заключается в "обратной мутации" одного или нескольких каркасных остатков до соответствующей гаметной последовательности. В частности, если антитело претерпело соматические мутации, то оно может содержать каркасные остатки, которые отличаются от той гаметной последовательности, из которой оно происходит. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения каркасных последовательностей антитела с теми гаметными последовательностями, из которых происходит антитело. Для того чтобы вернуть последовательности каркасной области к их гаметной конфигурации, соматические мутации можно подвергнуть "обратной мутации" до гаметной последовательности, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза (к примеру, "обратной мутации" из лейцина в метионин). Такие подвергнутые "обратной мутации" антитела тоже охватываются настоящим изобретением.

Другой тип каркасных модификаций включает мутации одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одном или нескольких участках CDR для удаления Т-клеточных эпитопов и тем самым уменьшения потенциальной иммуногенности антител. Этот подход также именуется "деиммунизацией" и более подробно описан в U.S. Patent Publication No. 2003/0153043 by Carr et al.

В дополнение или альтернативно к изменениям, производимым в каркасной области или участках CDR, антитела по изобретению могут подвергаться инженерии так, чтобы они включали модификации в пределах области Fc, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, как-то времени полужизни в сыворотке, фиксации комплемента, связывания Fc-рецепторами и/или антиген-зависимой клеточной цитотоксичности. Кроме того, mAb к 158P1D7 по изобретению могут подвергаться химической модификации (например, к антителу можно присоединить одну или несколько химических группировок) или модификации, изменяющей его гликозилирование, опять же для изменения одного или нескольких функциональных свойств mAb. Каждое из таких воплощений описано более подробно ниже.

В одном воплощении шарнирный участок CH1 подвергается модификации с тем, чтобы изменить количество остатков цистеина в шарнирном участке, например повысить или уменьшить. Такой подход подробно описан в U.S. Pat. No. 5,677,425 by Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирном участке CH1 изменяют, к примеру, затем, чтобы облегчить сборку легких и тяжелых цепей либо повысить или уменьшить стабильность mAb к 158P1D7.

В другом воплощении шарнирный участок области Fc антитела подвергается мутации с тем, чтобы уменьшить биологическое время полужизни mAb к 158P1D7. В частности, вводится одна или несколько аминокислотных мутаций в область стыковки доменов CH2-CH3 шарнирного участка Fc-фрагмента с тем, чтобы нарушить связывание антитела со стафилококковым белком А (SPA) по сравнению со связыванием с SpA Fc-фрагмента с нативным шарнирным участком. Этот подход описан более подробно в U.S. Pat. No. 6,165,745 by Ward et al.

В другом воплощении mAb к 158P1D7 подвергается модификации для повышения биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно ввести мутации, как описано в U.S. Pat. No. 6,277,375 на Ward. С другой стороны, для повышения биологического времени полужизни антитело можно подвергнуть изменению в пределах области C_H1 или C_L так, чтобы она содержала резервный эпитоп рецепторного связывания, взятый из двух петель домена C_H2 Fc-области IgG, как описано в U.S. Pat. Nos. 5,869,046 и 6,121,022 by Presta et al.

В еще других воплощениях Fc-область подвергается изменению путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток с тем, чтобы изменить эффекторную функцию mAb к 158P1D7. Например, одну или несколько аминокислот из числа определенных аминокислотных остатков можно заменить на другие аминокислотные остатки так, чтобы у антитела изменилось сродство к эффекторному лиганду, но сохранялась способность к связыванию антигена от исходного антитела. Эффекторным лигандом, сродство к которому изменяется, может быть, к примеру, Fc-рецептор или компонент комплемента C1. Этот подход более подробно описан в U.S. Pat. Nos. 5,624,821 и 5,648,260, both by Winter et al.

Реактивность антител к 158P1D7 к родственным 158P1D7 белкам можно установить при помощи ряда хорошо известных способов, включая вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, методы ELISA и FACS с использованием, по необходимости, родственных 158P1D7 белков, экспрессирующих 158P1D7 клеток либо их экстрактов. Антитела к 158P1D7 либо их фрагменты можно пометить детектируемым маркером или конъюгировать со второй молекулой. Подходящие детектируемые маркеры включают, без ограничения, радиоизотопы, флуоресцентные соединения, биолюминесцентные соединения, хемилюминесцентные соединения, хелаторы металлов или ферменты. Кроме того, с помощью хорошо известных методов получают биспецифичные антитела, специфичные к двум или нескольким эпитопам 158P1D7. Также можно получить гомодимерные антитела методами поперечной сшивки, известными в данной области (например, Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

В следующем предпочтительном воплощении mAb к 158P1D7 по изобретению представляет собой антитело, содержащее тяжелую и легкую цепь антитела, обозначенного Ha15-10ac12. Тяжелая цепь Ha15-10ac12 состоит из аминокислотной последовательности в пределах от 1-го остатка Q до 446-го остатка K в SEQ ID NO: 7, а легкая цепь Ha15-10ac12 состоит из аминокислотной последовательности в пределах от 1-го остатка D до 219-го остатка C в последовательности SEQ ID NO: 8. Данные последовательности приведены на фиг. 2 и 3. В предпочтительном воплощении Ha15-10ac12 конъюгировано с цитотоксическим средством.

Клетки яичников китайского хомячка (CHO), вырабатывающие антитело под названием Ha15-10ac12, были отправлены 25 июля 2012 г. (через Federal Express) в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, и получили номер доступа PTA-13102.

III. Конъюгаты антитело-лекарственное средство вообще.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, как-то химиотерапевтическим средством, ингибирующим рост лекарственным средством, средством, токсином (например, ферментативно активным токсином бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагментом) или радиоактивным изотоп (т.е. это радиоконъюгат). В другом аспекте изобретения также предусмотрены и способы применения ADCs. В одном аспекте ADC содержит любое из вышеприведенных mAb к 158P1D7, ковалентно связанное с цитотоксическим средством или детектируемым веществом.

Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство для локальной доставки цитотоксических или цитостатических средств, т.е. лекарственных средств для уничтожения или подавления опухолевых клеток при лечении рака (Syrgos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; U.S. Patent 4,975,278), позволяет осуществлять адресную доставку лекарственных молекул к опухолям и внутриклеточное накопление в них, если системное введение таких неконъюгированных лекарственных средств может привести к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток наряду с теми опухолевыми клетками, которые нужно устранить (Baldwin et al. (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cyto-

toxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, A. Pinchera et al. (eds), pp. 475-506). При этом стремятся достичь максимальной эффективности при минимальной токсичности. В этих стратегиях полезными оказались как поликлональные, так и моноклональные антитела (Rowland et al. (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Используемые в этих способах лекарственные средства включают дауномицин, доксорубин, метотрексат и виндезин (Rowland et al. (1986), выше). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины типа дифтерийного токсина, растительные токсины типа рицина, низкомолекулярные токсины типа гелданамицина (Mandler et al. (2000) *J. 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), майтансиноиды (EP 1391213; Liu et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) и калихеамицин (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Токсины могут оказывать свои цитотоксические и цитостатические эффекты через механизмы, включающие связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические средства склонны быть неактивными или менее активными при конъюгировании с крупными антителами или белковыми лигандами рецепторов.

Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включают Zevalin® (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idec), который представляет собой конъюгат антитело-радиоизотоп, состоящий из мышинового моноклонального антитела типа IgG1 каппа, направленного против антигена CD20, находящегося на поверхности нормальных и злокачественных В-лимфоцитов, и радиоизотопа ^{111}In или ^{90}Y , связанных через линкер типа тиомочевина-хелатор (Wiseman et al (2000) *Eur. J. 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).

К тому же Mylotarg™ (гемигузумаб озогамин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела к CD33 человека, соединенного с калихеамицином, был утвержден в 2000 г. для лечения острой миелоидной лейкемии посредством инъекций (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; US Patent Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001).

Кроме того, кантузумаб мертансин (Immunogen, Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела huC242, соединенного через дисульфидный линкер SPP с молекулой майтансиноидного препарата DM1, продвигается в испытания фазы II для лечения раковых заболеваний, экспрессирующих CanAg, как-то рака толстой кишки, поджелудочной железы, желудка и др.

К тому же MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из моноклонального антитела против специфического мембранного антигена простаты (PSMA), соединенного с молекулой майтансиноидного препарата DM1, находится в стадии разработки для потенциального лечения опухолей предстательной железы.

Наконец, ауристатиновые пептиды типа монометилауристатинон Е (ММАЕ), синтетические аналоги доластатина, были конъюгированы с химерными моноклональными антителами cBR96 (оно специфично к Lewis Y на карциномах) и cAC10 (оно специфично к CD30 на гематологических раковых новообразованиях) (Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784). cAC10 находится в стадии терапевтической разработки.

Далее, здесь описаны химиотерапевтические средства, пригодные для получения ADCs. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Например, см. WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г. Доступно множество радионуклидов для получения радиоconъюгированных антител. Их примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re . Конъюгаты антител с цитотоксическими средствами получают с помощью целого ряда бифункциональных сшивающих белки реагентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональных производных имидоэфиров (типа диметиладипимидата-HCl), активных сложных эфиров (типа дисукцинимидилсуберата), альдегидов (типа глутарового альдегида), бис-азидосоединений (типа бис-(пара-азидобензоил)гександиамина), производных бис-дiazония (типа бис-(п-diazонийбензоил)-этилендиамина), диизоцианатов (типа толуол-2,6-диизоцианата) и активных бис-соединений фтора (типа 1,5-дифтор-2,4-динитробензола). Например, иммунотоксин рицина может быть получен так, как описано в Vitetta et al. (1987) *Science*, 238:1098. Типичным хелатором для конъюгирования радионуклидов с антителами (WO 94/11026) является меченная ^{14}C 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен-триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA).

В настоящем изобретении также предусмотрены конъюгаты антител с одним или несколькими низкомолекулярными токсинами, такими как калихеамицин, майтансиноиды, доластатин, ауристатины, трихотецены и CC1065, а также производными этих токсинов, обладающими активностью токсина.

III(A). Майтансиноиды.

Соединения майтансина, пригодные для применения в качестве молекул майтансиноидных препаратов, хорошо известны в данной области и могут быть выделены из природных источников в соответствии с известными методами, получены с помощью методов генной инженерии (см. Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973), или же майтансинол и аналоги майтансинола могут быть получены синтетически в соответствии с известными методами.

Примеры молекул майтансиноидных препаратов включают молекулы, содержащие модифицированное ароматическое кольцо, как-то: C-19-дехлор (US 4256746) (получают восстановлением ансамитоцина P2 гидридом лития-алюминия); C-20-гидрокси (или C-20-деметил) $\pm$ C-19-дехлор (US Pat. Nos. 4,361,650 и 4,307,016) (получают путем деметилирования с помощью *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с помощью LAH); и C-20-деметокси, C-20-ацилокси (-OCOR) $\pm$ дехлор (U.S. Pat. No. 4,294,757) (получают путем ацилирования с помощью ацилхлоридов); и те, у которых модификации в других положениях.

Примеры молекул майтансиноидных препаратов также включают молекулы, содержащие такие модификации, как: C-9-SH (US 4,424,219) (получают при реакции майтансинола с H_2S или P_2S_5); C-14-алкоксиметил(деметокси/ CH_2OR) (US 4331598); C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH_2OH или CH_2OAc) (US 4,450,254) (получают из *Nocardia*); C-15-гидрокси/ацилокси (US 4,364,866) (получают при преобразовании майтансинола *Streptomyces*); C-15-метокси (US Pat. Nos. 4,313,946 и 4,315,929) (выделяют из *Trewia nudiflora*); C-18-N-деметил (US Pat. Nos. 4,362,663 и 4,322,348) (получают при деметилировании майтансинола *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (US 4,371,533) (получают восстановлением майтансинола трихлоридом титана/LAH).

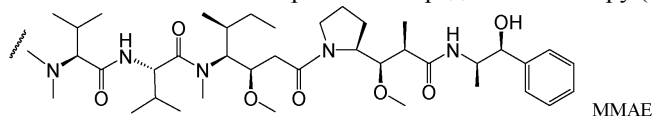
ADCs, содержащие майтансиноиды, методы их получения и их терапевтическое применение изложены, к примеру, в U.S. Patent Nos. 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 и European Patent EP 0 425 235 B1, содержание которых прямо включено сюда путем ссылки. В работе Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) описаны ADCs, содержащие майтансиноид, названный DM1, связанный с моноклональным антителом C242, направленным против колоректального рака у человека. Конъюгат оказался очень цитотоксичным в отношении культивируемых клеток рака толстой кишки и проявлял противоопухолевую активность при анализе роста опухолей *in vivo*. В работе Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) описаны ADCs, у которых майтансиноид конъюгирован через дисульфидный линкер с мышиным антителом A7, связывающимся с антигеном на клетках раковых линий толстой кишки человека, или с другим мышиным моноклональным антителом TA.1, связывающимся с онкогеном HER-2/neu. Цитотоксичность конъюгата TA.1-майтансиноид тестировали *in vitro* на клетках раковой линии молочной железы человека SK-BR-3, которые экспрессируют 3×10^5 поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Конъюгат препарата достигает степени цитотоксичности, аналогичной препарату свободного майтансиноида, которая может возрастать при увеличении числа молекул майтансиноида на молекулу антитела. Конъюгат A7-майтансиноид проявлял низкую системную цитотоксичность на мышах.

III(B). Ауристатин и доластатин.

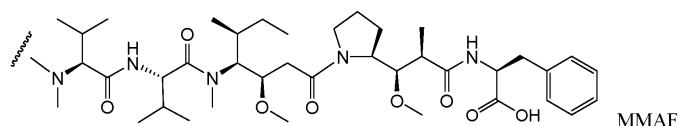
В некоторых воплощениях конъюгат ADC включает антитело по изобретению, конъюгированное с доластатином или пептидным аналогом или производным доластатина - ауристатином (US Patent Nos. 5,635,483; 5,780,588). Было показано, что доластатин и ауристатин нарушают динамику микротрубочек, гидролиз GTP и деление ядер и клеток (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковой (US 5,663,149) и противогрибковой активностью ((Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Молекулы доластатина или ауристатина в лекарственном средстве могут присоединяться к антителу по N-концу или C-концу молекулы пептидного препарата (WO 02/088172).

Примеры воплощений с ауристатином включают связанные по N-концу молекулы препаратов монотилауристатина DE и DF, приведенные в "Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004" и описанные в United States Patent Publication No. 2005/0238649, содержание которой прямо включено сюда путем ссылки во всей полноте.

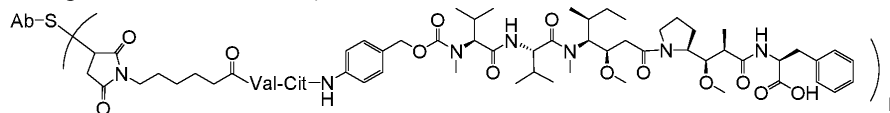
Типичным воплощением ауристатина является MMAE (при этом волнистая линия означает ковалентное присоединение конъюгата антитело-лекарственное средство к линкеру (L)):



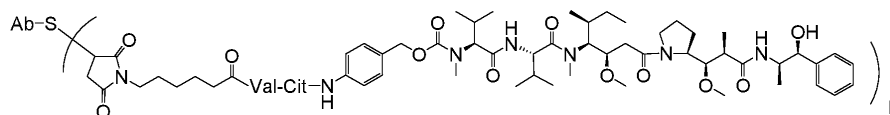
Другим типичным воплощением ауристатина является MMAF, при этом волнистая линия означает ковалентное присоединение конъюгата антитело-лекарственное средство к линкеру (L) (US 2005/0238649):



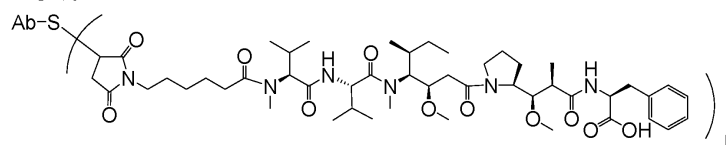
Дополнительные типичные воплощения, включающие MMAE или MMAF и различные линкерные компоненты (подробно описанные далее), имеют следующие структуры и сокращения (при этом Ab означает антитело, а p составляет от 1 до 8):



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

Как правило, молекулы препаратов на основе пептидов могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или несколькими аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, к примеру, методом синтеза в жидкой фазе (см. E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Молекулы препаратов ауристатина/доластатина средств могут быть получены в соответствии со способами в: US 5635483; US 5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit G.R. et al. (1996) Synthesis, 719-725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15: 859-863; и Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784.

III(C). Калихеамицин.

В других воплощениях ADC включает антитело по изобретению, конъюгированное с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Семейство калихеамициновых антибиотиков способно вызывать разрывы в двухцепочечной ДНК в субпикомолярных концентрациях. Насчет получения конъюгатов с калихеамицинами см. U.S. Patents 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 и 5,877,296 (все на American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают, без ограничения, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-ацетил- γ_1^1 , PSAG и θ^1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998); и вышеприведенные патенты U.S. на American Cyanamid). Другое противоопухолевое лекарственное средство, с которым можно конъюгировать антитело - QFA, который является антифолатом. И калихеамицин, и QFA действуют внутриклеточно и с трудом проходят через плазматическую мембрану. Следовательно, захват этих средств клетками через опосредованную антителами интернализацию значительно усиливает их цитотоксическое действие.

III(D). Другие цитотоксические средства.

Другие противоопухолевые средства, которые можно конъюгировать с антителами по изобретению, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство веществ, собирательно известных как комплекс LL-E33288, описанный в U.S. Patents 5,053,394, 5,770,710, а также эсперамицины (U.S. Patent 5,877,296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaire officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Например, см. WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г.

Настоящим изобретением также предусмотрены конъюгаты ADC, образованные между антителом и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой типа дезоксирибонуклеазы; ДНКазы).

Для избирательного разрушения опухолей антитело может содержать сильно радиоактивный атом. Доступно множество радионуклидов для получения радиоактивно конъюгированных антител. Их примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. При использова-

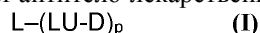
нии конъюгатов для детектирования они могут содержать радиоактивный атом для сцинтиграфии, к примеру, Tc^{99m} или I^{123} , либо спиновую метку для ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) томографии (также известна как магнитно-резонансная томография, MRI), как-то еще раз йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивные или другие метки могут быть включены в конъюгат известными способами. Например, можно биосинтезировать или синтезировать пептид посредством химического синтеза из аминокислот с использованием подходящих предшественников аминокислот, к примеру, содержащих фтор-19 вместо водорода. Такие метки, как Tc^{99m} или I^{123} , Re^{186} , Re^{188} и In^{111} можно присоединить через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 можно присоединить через остаток лизина. Для включения йода-123 можно использовать метод Iodogen (Fraker et al. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57). Другие методы подробно описаны в "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989).

IV. Конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые связывают 158P1D7.

Настоящим изобретением предусмотрены, среди прочего, конъюгаты антитело-лекарственное средство для адресной доставки лекарственных средств. Авторы изобретения сделали открытие, что конъюгаты антитело-лекарственное средство обладают сильной цитотоксической и/или цитостатической активностью против клеток, экспрессирующих 158P1D7. Конъюгаты антитело-лекарственное средство включают звено антитела, ковалентно связанное по меньшей мере с одним звеном лекарственного средства. Звено лекарственного средства может ковалентно соединяться непосредственно или через звено линкера (-LU-).

В некоторых воплощениях конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую формулу



либо его фармацевтически приемлемая соль или сольват;

где L означает звено антитела, например mAb к 158P1D7 настоящего изобретения; а

(LU-D) означает группировку звено линкера-звено лекарственного средства, при этом:

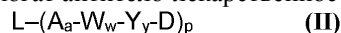
LU- означает звено линкера,

-D означает звено лекарственного средства, обладающее цитостатической или цитотоксической активностью против клеток мишени; а

p - целое число от 1 до 20.

В некоторых воплощениях p составляет 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 воплощениях p составляет 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 некоторых воплощениях p равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых воплощениях p равно 2 или 4.

В некоторых воплощениях конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую формулу



либо его фармацевтически приемлемая соль или сольват;

где L означает звено антитела, например mAb к 158P1D7; а

-A_a-W_w-Y_y- означает звено линкера (LU), при этом:

-A- означает звено удлинителя, а равно 0 или 1,

каждый -W- независимо означает аминокислотное звено,

w - целое число от 0 до 12,

-Y- означает звено самоликвидирующегося спейсера,

y равно 0, 1 или 2;

-D означает звено лекарственного средства, обладающее цитостатической или цитотоксической активностью против клеток мишени; а p - целое число от 1 до 20.

В некоторых воплощениях a равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а y равно 0, 1 или 2. В некоторых воплощениях a равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а y равно 0 или 1. В некоторых воплощениях p составляет 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 воплощениях p составляет 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 воплощениях p равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых воплощениях p равно 2 или 4. В некоторых воплощениях, если w не равно 0, то y равно 1 или 2. В некоторых воплощениях, если w составляет от 1 до 12, то y равно 1 или 2. В некоторых воплощениях w составляет от 2 до 12, а y равно 1 или 2. В некоторых воплощениях a равно 1, а w и y равны 0.

У композиций, содержащих несколько антител, нагруженность лекарственным средством представлена p, т.е. средним числом молекул лекарственного средства на 1 антитело. Нагруженность лекарственным средством может составлять от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на 1 антитело. Среднее число молекул лекарственного средства на 1 антитело при проведении реакций конъюгирования можно установить стандартными методами типа масс-спектропии, ELISA и HPLC. Также можно определить количественное распределение конъюгатов антитело-лекарственное средство по значениям p. В некоторых случаях можно проводить разделение, очистку и характеристику однородных конъюгатов антитело-лекарственное средство с определенным значением p от конъюгатов антитело-лекарственное средство с другой нагруженностью лекарственным средством такими методами, как обратноточная HPLC или электрофорез. В типичных воплощениях p составляет от 2 до 8.

Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство может осуществляться любым методом, известным специалистам. Вкратце, конъюгаты антитело-лекарственное средство включают mAb к 158P1D7 в качестве звена антитела, лекарственное средство и необязательно линкер, который соединяет лекарственное средство и связывающее средство. В предпочтительном воплощении антитело представлено mAb к 158P1D7, включающим переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного Ha15-10ac12, которое описано выше. В более предпочтительном воплощении антитело представлено mAb к 158P1D7, включающим тяжелую и легкую цепь антитела, обозначенного Ha15-10ac12, которое описано выше. Существует несколько различных реакций для ковалентного присоединения лекарственных средств и/или линкеров к связывающим средствам. Зачастую это осуществляется при реакции аминокислотных остатков связывающего средства, например, молекулы антитела, в том числе аминокислотных групп лизина, свободных карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильных групп цистеина и различных группировок ароматических аминокислот.

Одним из наиболее широко применяемых неспецифических методов ковалентного присоединения является карбодимидная реакция между карбоксигруппой (или аминокислотной группой) антитела. Кроме того, применялись и бифункциональные реагенты типа диальдегидов или имидоэфиров для связывания аминокислотных групп соединения с аминокислотными группами молекулы антитела. Также для присоединения лекарственных средств к связывающим средствам доступны реакции с основаниями Шиффа. Этот метод включает окисление периодатом лекарственного средства, содержащего гликоль или гидроксильные группы, при этом образуется альдегид, который затем реагирует со связывающим средством. Присоединение идет через образование основания Шиффа с аминокислотными группами связывающего средства. Также в качестве конденсирующих реагентов для ковалентного присоединения лекарственных средств к связывающим средствам можно использовать изотиоцианаты. Специалистам известны и другие методы в объеме настоящего изобретения.

В некоторых воплощениях проводится реакция промежуточного соединения - предшественника линкера с лекарственным средством при соответствующих условиях. В некоторых воплощениях используются реакционноспособные группы самого лекарственного средства и/или промежуточного соединения. После этого продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным соединением или дериватизированное лекарственное средство подвергают реакции с mAb к 158P1D7 при соответствующих условиях.

Далее каждое из отдельных звеньев конъюгатов антитело-лекарственное средство более подробно описано ниже. Синтез и структура типичных звеньев линкера, звеньев удлинителя, аминокислотных звеньев, самоликвидирующихся звеньев спейсера и звеньев лекарственного средства также описаны в U.S. Patent Application Publication Nos. 2003-0083263, 2005-0238649 и 2005-0009751, каждая из которых включена сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи.

V. Звено линкера.

Как правило, конъюгаты антитело-лекарственное средство включают звено линкера между звеном лекарственного средства и звеном антитела. В некоторых воплощениях линкер может отщепляться при внутриклеточных условиях с тем, что при отщеплении линкера во внутриклеточной среде звено лекарственного средства отделяется от антитела. В других воплощениях звено линкера не может отщепляться, а лекарственное средство высвобождается, к примеру, при деградации антитела.

В некоторых воплощениях линкер отщепляется под действием расщепляющего средства, присутствующего во внутриклеточной среде (например, в лизосомах или эндосомах или кавеолах). Линкером может быть, например, пептидный линкер, который отщепляется внутриклеточным ферментом пептидазой или протеазой, включая, без ограничения, лизосомные или эндосомные протеазы. В некоторых воплощениях пептидный линкер имеет длину по меньшей мере в 2 аминокислоты или 3 аминокислоты. Расщепляющие средства могут включать катепсины B и D и плазмин, которые все, как известно, гидролизуют дипептидные производные лекарственных средств, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутри клеток мишени (например, см. Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Наиболее типичными являются пептидные линкеры, которые расщепляются ферментами, находящимися в экспрессирующих 158P1D7 клетках. Например, можно использовать пептидный линкер, который расщепляется тиол-зависимой протеазой - катепсином B, который экспрессируется на высоком уровне в раковых тканях (например, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 9)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в U.S. Patent No. 6,214,345, включенном сюда путем ссылки во всей полноте и на все случаи. В конкретном воплощении пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточными протеазами, представлен линкером Val-Cit или линкером Phe-Lys (например, см. U.S. Patent 6,214,345, в котором описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтических средств является то, что обычно эти средства ослабляются при конъюгировании, а стабильность конъюгатов в сыворотке, как правило, высока.

В других воплощениях расщепляемый линкер является pH-чувствительным, т.е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительные линкеры гидролизуются в кислых условиях. Например, можно использовать кислотолабильный линкер, который будет подвергаться

ся гидролизу в лизосомах (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т.п.) (например, см. U.S. Patent Nos. 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) Такие линкеры относительно стабильны при нейтральных значениях pH, как в крови, но неустойчивы при pH ниже 5,5 или 5,0, т.е. примерно как pH в лизосомах. В некоторых воплощениях гидролизуемый линкер представлен тиоэфирным линкером (таким, например, как тиоэфир, присоединенный к терапевтическому средству через ацетилгидразоновую связь (например, см. U.S. Patent No. 5,622,929).

Еще в других воплощениях линкер расщепляется при восстановительных условиях (например, дисульфидный линкер). Известно несколько дисульфидных линкеров, включая, к примеру, линкеры, которые получаются с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDП (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил- α -метил- α -(2-пиридилдитио)толуол), SPDB и SMPT (например, см. Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). Также см. U.S. Patent No. 4,880,935).

А в других конкретных воплощениях линкер представлен 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).

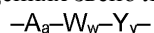
В других воплощениях звено линкера не отщепляется, а лекарственное средство высвобождается при деградации антитела (например, см. U.S. Publication No. 2005/0238649, включенную сюда путем ссылки во всей полноте и на все случаи).

Как правило, линкер практически не чувствителен к внеклеточной среде. В настоящем описании "практически не чувствителен к внеклеточной среде" в контексте линкера означает, что при нахождении конъюгата антитело-лекарственное средство во внеклеточной среде (к примеру, в плазме) расщепляется не более 20%, обычно не более 15%, чаще не более 10% и еще чаще не более 5%, не более 3% или не более 1% линкера в образце конъюгата антитело-лекарственное средство. Будет ли линкер практически не чувствительным к внеклеточной среде, можно определить, к примеру, путем инкубации конъюгата антитело-лекарственное средство с плазмой в течение заданного времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 ч), а затем определения количества свободного лекарственного средства, присутствующего в плазме.

В других, не исключающих друг друга воплощениях, линкер способствует клеточной интернализации. В некоторых воплощениях линкер способствует клеточной интернализации при конъюгировании с терапевтическим средством (т.е. в составе группировки линкер-терапевтическое средство у конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано здесь). В других воплощениях линкер способствует клеточной интернализации при конъюгировании одновременно с соединением ауристатиона и mAb к 158P1D7.

Различные типичные линкеры, которые можно использовать с композициями и способами настоящего изобретения, описаны в WO 2004/010957, U.S. Publication No. 2006/0074008, U.S. Publication No. 2005/0238649 и U.S. Publication No. 2006/0024317 (каждая из которых включена сюда путем ссылки во всей полноте и на все случаи).

"Звено линкера" (LU) является бифункциональным соединением, которое может использоваться для соединения звена лекарственного средства и звена антитела с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство. В некоторых воплощениях звено линкера соответствует формуле



где -A- означает звено удлинителя;

а равно 0 или 1;

каждый W независимо означает аминокислотное звено;

w - целое число от 0 до 12;

-Y- означает звено самоликвидирующегося спейсера; а

у равно 0, 1 или 2.

В некоторых воплощениях а равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а у равно 0, 1 или 2. В некоторых воплощениях а равно 0 или 1, w равно 0 или 1, а у равно 0 или 1. В некоторых воплощениях, если w составляет от 2 до 12, то у равно 1 или 2. В некоторых воплощениях w составляет от 2 до 12, а у равно 1 или 2. В некоторых воплощениях а равно 1, а w и у равны 0.

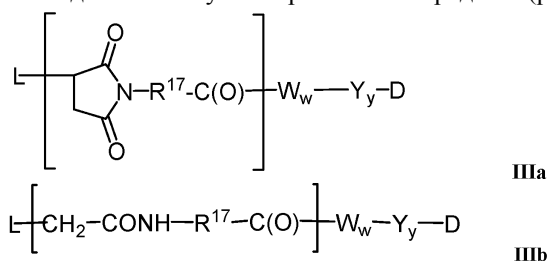
VI. Звено удлинителя.

Звено удлинителя (A), когда оно есть, может связывать звено антитела с аминокислотным звеном (-W-), если оно есть, со звеном спейсера (-Y-), если оно есть, или со звеном лекарственного средства (-D). Полезные функциональные группы, которые могут присутствовать у mAb к 158P1D7 (например, Ha15-10ac12), естественным образом или посредством химической манипуляции, включают, без ограничения, сульфгидрильные, аминогруппы, гидроксильные, аномерные гидроксильные группы углеводов и карбоксигруппы. Подходящими функциональными группами являются сульфгидрильные и аминогруппы. В одном воплощении сульфгидрильные группы можно получить при восстановлении внутримолекулярных

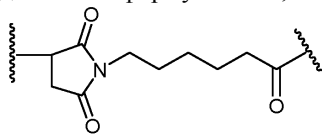
дисульфидных связей у mAb к 158P1D7. В другом воплощении сульфгидрильные группы можно получить при реакции аминогруппы лизина у mAb к 158P1D7 с помощью 2-иминотиолана (реактанта Траута) или других генерирующих сульфгидрилы реагентов. В некоторых воплощениях mAb к 158P1D7 является рекомбинантным антителом и подвергается инженерии таким образом, чтобы оно несло один или несколько остатков лизина. В некоторых других воплощениях рекомбинантное mAb к 158P1D7 подвергается инженерии таким образом, чтобы оно несло дополнительные сульфгидрильные группы, например дополнительные остатки цистеина.

В одном воплощении звено удлинителя образует связь с атомом серы у звена антитела. Атом серы может происходить из сульфгидрильной группы антитела. Репрезентативные звенья удлинителя по этому воплощению представлены в квадратных скобках формул IIIa и IIIb, где L-, -W-, -Y-, -D, w и y определены выше, а R¹⁷ выбран из -C₁-C₁₀-алкилена-, -C₂-C₁₀-алкенилена-, -C₂-C₁₀-алкинилена-, карбоцикло-, -O-(C₁-C₈-алкилена)-, O-(C₂-C₈-алкенилена)-, -O-(C₂-C₈-алкинилена)-, -арилена-, -C₁-C₁₀-алкилен-арилена-, -C₂-C₁₀-алкенилен-арилена-, -C₂-C₁₀-алкинилен-арилена-, -арилен-C₁-C₁₀-алкилена-, -арилен-C₂-C₁₀-алкенилена-, -арилен-C₂-C₁₀-алкинилена-, -C₁-C₁₀-алкилен-(карбоцикло)-, -C₂-C₁₀-алкенилен-(карбоцикло)-, -C₂-C₁₀-алкинилен-(карбоцикло)-, (карбоцикло)-C₁-C₁₀-алкилена-, -(карбоцикло)-C₂-C₁₀-алкенилена-, -(карбоцикло)-C₂-C₁₀-алкинилена-, -гетероцикло-, -C₁-C₁₀-алкилен-(гетероцикло)-, -C₂-C₁₀-алкенилен-(гетероцикло)-, -C₂-C₁₀-алкинилен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀-алкилена-, (гетероцикло)-C₂-C₁₀-алкенилена-, -(гетероцикло)-C₂-C₁₀-алкинилена-, -(CH₂CH₂O)_r- и -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, где r - целое число от 1 до 10, причем радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл, карбоцикло, гетероцикло и арилен, по отдельности или в составе другой группы, необязательно являются замещенными. В некоторых воплощениях радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл, карбоцикло, гетероцикло и арилен, по отдельности или в составе другой группы, не являются замещенными. В некоторых воплощениях R¹⁷ выбран из -C₁-C₁₀-алкилена-, -карбоцикло-, -O-(C₁-C₈-алкилена)-, -арилена-, -C₁-C₁₀-алкилен-арилена-, -арилен-C₁-C₁₀-алкилена-, -C₁-C₁₀-алкилен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C₁-C₁₀-алкилена-, -C₃-C₈-гетероцикло-, -C₁-C₁₀-алкилен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀-алкилена-, -(CH₂CH₂O)_r- и -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, где r - целое число от 1 до 10, причем радикалы алкилена не замещены, а остальные группы необязательно являются замещенными.

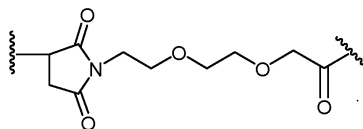
Из всех типичных воплощений должно быть понятно, что даже там, где это прямо не обозначено, с антителом могут соединяться от 1 до 20 молекул лекарственного средства (p=1-20).



Типичное звено удлинителя представлено формулой IIIa, в которой R¹⁷ означает -(CH₂)₅-

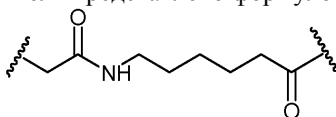


Другое типичное звено удлинителя представлено формулой IIIa, в которой R¹⁷ означает -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, а r равно 2

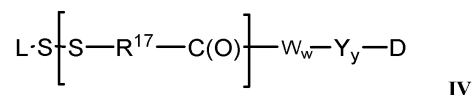


Другое типичное звено удлинителя представлено формулой IIIa, в которой R¹⁷ означает арилен- или арилен-C₁-C₁₀-алкилен-. В некоторых воплощениях арильная группа представлена незамещенной фенильной группой.

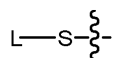
Еще одно типичное звено удлинителя представлено формулой IIIb, в которой R¹⁷ означает -(CH₂)₅-



В некоторых воплощениях звено удлинителя соединяется со звеном антитела через дисульфидную связь между атомом серы у звена антитела и атомом серы у звена удлинителя. Репрезентативное звено удлинителя по этому воплощению представлено в квадратных скобках формулы IV, где R¹⁷, L-, -W-, -Y-, -D, w и y уже определены выше.

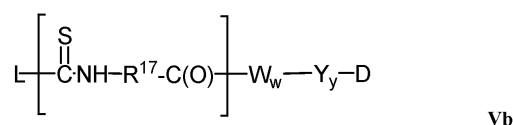
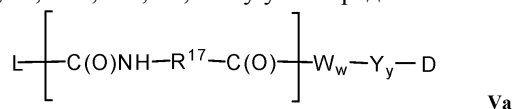


Следует отметить, что по всей заявке в приведенной ниже формуле S означает атом серы у звена антитела, если из контекста не следует иное.

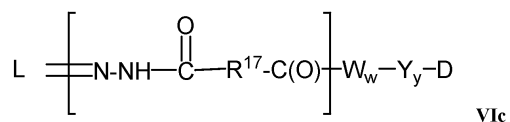
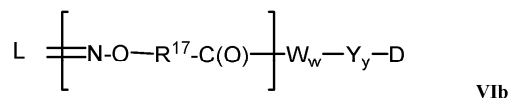
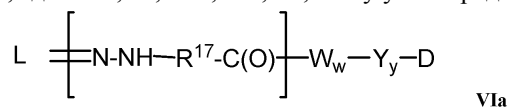


А в других воплощениях удлинитель содержит реакционноспособный участок, который может образовывать связь с первичной или вторичной аминогруппой антитела.

Примеры таких реакционноспособных участков включают, без ограничения, активированные сложные эфиры типа сукцинимидных эфиров, 4-нитрофениловых эфиров, пентафторфениловых эфиров, тетрафторфениловых эфиров, ангидридов, хлорангидридов, сульфонилхлоридов, изоцианатов и изотиоцианатов. Репрезентативные звенья удлинителя по этому воплощению представлены в квадратных скобках формул Va и Vb, где $-R^{17}$ -, L-, -W-, -Y-, -D, w и y уже определены выше



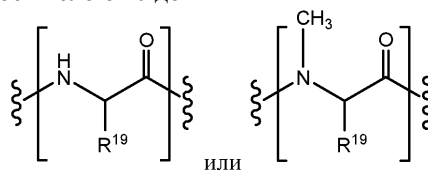
В некоторых воплощениях удлинитель содержит реакционноспособный участок, который реагирует с модифицированной углеводной (-CHO) группой, которая может быть у антитела. Например, углевод можно подвергнуть мягкому окислению с помощью такого реагента, как периодат натрия, а образовавшееся звено (-CHO) окисленного углевода подвергнуть конденсации с удлинителем, содержащим такую функциональную группу, как гидразид, оксим, первичный или вторичный амин, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат или арилгидразид типа тех, что описаны в Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41. Репрезентативные звенья удлинителя по этому воплощению представлены в квадратных скобках формул VIa, VIb и VIc, где $-R^{17}$ -, L-, -W-, -Y-, -D, w и y уже определены выше:



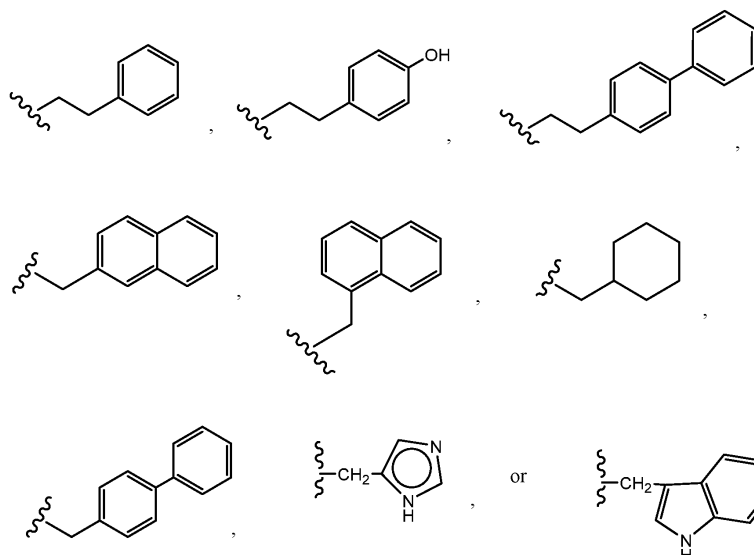
VII. Аминокислотное звено.

Аминокислотное звено (-W-), когда оно есть, соединяет звено удлинителя со звеном спейсера, если есть звено спейсера, соединяет звено удлинителя со звеном лекарственного средства, если нет звена спейсера, и соединяет звено антитела со звеном лекарственного средства, если нет звена удлинителя и звена спейсера.

Звено W_w - может представлять собой, к примеру, монопептид, дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид, гексапептид, гептапептид, октапептид, нонапептид, декапептид, ундекапептид или додекапептид. Каждое звено -W- независимо друг от друга соответствует формуле, приведенной ниже в квадратных скобках, а w означает целое число от 0 до 12

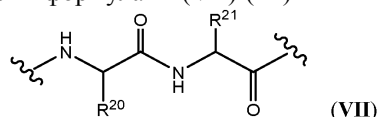


где R^{19} означает водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, п-гидроксibenзил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$,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

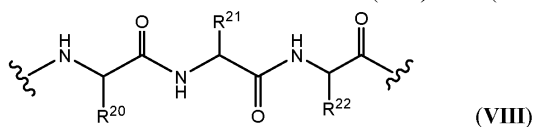
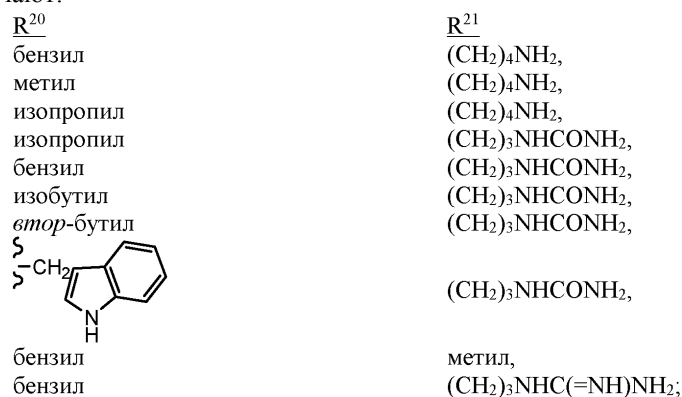


В некоторых воплощениях аминокислотное звено может энзиматически расщепляться одним или несколькими ферментами, в том числе протеазами, связанными с раком или опухолями, высвобождая звено лекарственного средства (-D), которое в одном воплощении после высвобождения протонируется *in vivo*, образуя лекарственное средство (D).

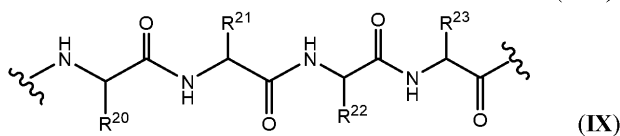
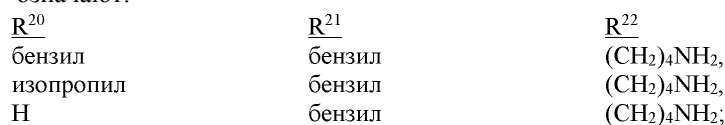
В некоторых воплощениях аминокислотное звено может содержать природные аминокислоты. В других воплощениях аминокислотное звено может содержать не встречающиеся в природе аминокислоты. Типичные звенья W_w представлены формулами (VII)-(IX)



где R^{20} и R^{21} означают:



где R^{20} , R^{21} и R^{22} означают:



где R^{20} , R^{21} , R^{22} и R^{23} означают:



Типичные аминокислотные звенья включают, без ограничения, звенья по формуле VII,

где R^{20} означает бензил, а R^{21} означает $-(CH_2)_4NH_2$; или R^{20} означает изопропил, а R^{21} означает $-(CH_2)_4NH_2$; или R^{20} означает изопропил, а R^{21} означает $-(CH_2)_3NHCONH_2$. Другое типичное аминокислотное звено - звено по формуле VIII, где R^{20} означает бензил, R^{21} означает бензил, а R^{22} означает $-(CH_2)_4NH_2$.

Полезные звенья $-W_w-$ можно разработать и оптимизировать по избирательности в отношении энзиматического расщепления определенными ферментами, к примеру, связанными с опухолями протеазами. В одном воплощении звено $-W_w-$ таково, что его расщепление катализируется катепсином В, С или D либо плазминовой протеазой.

В одном воплощении $-W_w-$ является дипептидом, трипептидом, тетрапептидом или пентапептидом. Когда R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} или R^{23} отличается от водорода, то атом углерода, к которому прикрепляется R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} или R^{23} , является хиральным.

Каждый атом углерода, к которому прикрепляется R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} или R^{23} , независимо имеет (S)- или (R)-конфигурацию.

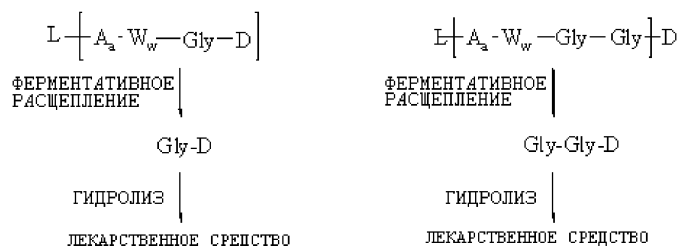
В одном аспекте аминокислотного звена им служит валин-цитруллин (VC или Val-Cit). В другом аспекте аминокислотным звеном служит фенилаланин-лизин (т.е. FK). В следующем аспекте аминокислотного звена им служит N-метилвалин-цитруллин. В следующем аспекте аминокислотным звеном служит 5-аминовалериановая кислота, гомофенилаланин-лизин, тетраизохинолинкарбоксилат-лизин, циклогексилаланин-лизин, изоникотиновая кислота-лизин, бета-аланин-лизин или глицин-серин-валин-глутамин-изоникотиновая кислота.

VIII. Звено спейсера.

Звено спейсера ($-Y-$), когда оно есть, соединяет аминокислотное звено со звеном лекарственного средства, если есть аминокислотное звено. С другой стороны, звено спейсера соединяет звено удлинителя со звеном лекарственного средства, если нет аминокислотного звена. Звено спейсера также соединяет звено лекарственного средства со звеном антитела, если нет ни аминокислотного звена, ни звена удлинителя.

Звенья спейсера относятся к двум основным типам: не самоликвидирующиеся (поп self-immolative) и самоликвидирующиеся (self-immolative). Несамолквидирующиеся звенья спейсера таковы, что у них часть или все звено спейсера остается связанным со звеном лекарственного средства после отщепления, особенно энзиматического, аминокислотного звена от конъюгата антитело- лекарственное средство. Примеры несамолквидирующихся звеньев спейсера включают, без ограничения, звено спейсера (глицин-глицин) и звено спейсера из одного глицина (оба представлены ниже на схеме 1). Когда конъюгат, содержащий звено спейсера глицин-глицин или звено спейсера из одного глицина, подвергается энзиматическому расщеплению ферментом (например, связанной с опухолевыми клетками протеазой, связанной с раковыми клетками протеазой или связанной с лимфоцитами протеазой), то от $L-A_a-W_w-$ отщепляется группировка глицин-глицин-лекарственное средство или группировка глицин-лекарственное средство. В одном воплощении в клетках мишени протекает независимая реакция гидролиза, при этом расщепляется связь группировки глицин-лекарственное средство и высвобождается лекарственное средство.

Схема 1



В некоторых воплощениях несамолквидирующееся звено спейсера ($-Y-$) представлено $-Gly-$. В некоторых воплощениях несамолквидирующееся звено спейсера ($-Y-$) представлено $-Gly-Gly-$.

В одном воплощении предусмотрены конъюгаты лекарственное средство-линкер, у которых звено спейсера отсутствует ($y=0$), либо их фармацевтически приемлемые соли или сольваты.

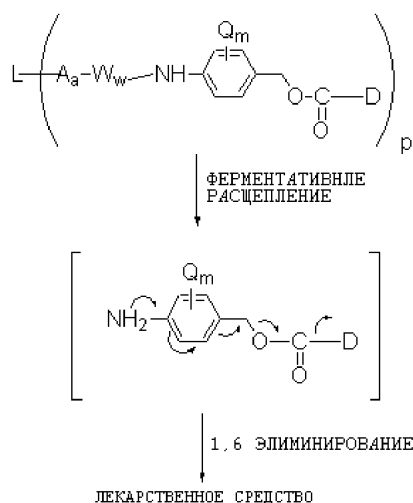
С другой стороны, конъюгаты, содержащие самоликвидирующееся звено спейсера, могут высвобождать $-D$. В настоящем описании термин "самоликвидирующийся спейсер" относится к бифункциональной химической группировке, которая способна ковалентно соединять друг с другом две разделенные химические группировки с образованием устойчивой тройной молекулы. Он должен спонтанно отделяться от второй химической группировки при расщеплении его связи с первой группировкой.

В некоторых воплощениях $-Y_y-$ означает звено п-аминобензилового спирта (РАВ) (см. схемы 2 и 3), у которого фениленовая часть заменена на Q_m , где Q означает $-C_1-C_8$ -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), -галоген, -нитро или -циано; а m - целое число от 0 до 4. Радикалы алкил, алкенил и алкинил, по отдельности или в составе другой группы, необязательно могут быть замещенными.

В некоторых воплощениях $-Y-$ означает группу РАВ, которая соединяется с $-W_w-$ через атом азота аминогруппы РАВ и непосредственно связана с $-D$ через радикал карбоната, карбамата или простого

эфира. Не придерживаясь какой-либо конкретной теории или механизма, на схеме 2 представлен возможный механизм отсоединения лекарственного средства от группы РАВ, которая непосредственно соединяется с -D через радикал карбамата или карбоната, как описано в Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872.

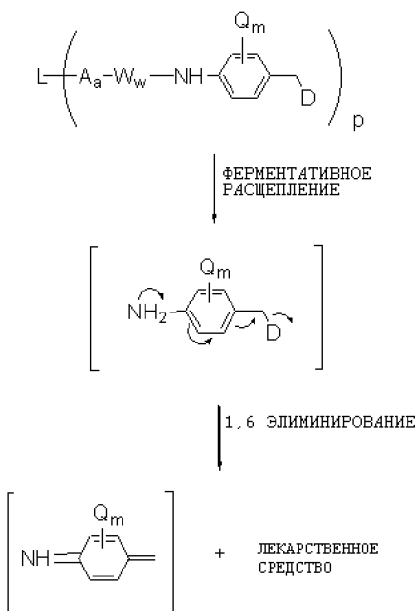
Схема 2



На схеме 2 Q означает -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил, -C₂-C₈-алкинил, -O-(C₁-C₈-алкил), -O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m - целое число от 0 до 4; а p - от 1 до 20. Радикалы алкил, алкенил и алкинил, по отдельности или в составе другой группы, необязательно могут быть замещенными.

Не придерживаясь какой-либо конкретной теории или механизма, на схеме 3 представлен возможный механизм отсоединения лекарственного средства от группы РАВ, которая непосредственно соединяется с -D через эфирную или аминную связь, причем D включает атом кислорода или азота, входящий в состав звена лекарственного средства.

Схема 3



На схеме 3 Q означает -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил, -C₂-C₈-алкинил, -O-(C₁-C₈-алкил), -O-(C₂-C₈-алкенил), -O-(C₂-C₈-алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m - целое число от 0 до 4; а p - от 1 до 20. Радикалы алкил, алкенил и алкинил, по отдельности или в составе другой группы, необязательно могут быть замещенными.

Другие примеры самоликвидирующихся спейсеров включают, без ограничения, ароматические соединения, которые по электронике похожи на РАВ, как-то производные 2-аминоимидазол-5-метанола (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто-или пара-аминобензилацетали. Можно использовать спейсеры, которые подвергаются циклизации после гидролиза амидной связи, как-то амиды замещенной и незамещенной 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), замещенные соответствующим образом бицикло[2.2.1]- и бицикло[2.2.2]-кольцевые системы (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry et al.,

1990, J. Org. Chem. 55:5867). Элиминация аминоксодержащих препаратов, замещенных в α -положении глицина (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447), также дает примеры самоликвидирующихся спейсеров.

В одном воплощении звено спейсера представлено звеном разветвленного бис-(гидроксиметил)-стирола (BHMS), как показано на схеме 4, которое можно использовать для включения и высвобождения нескольких лекарственных средств.

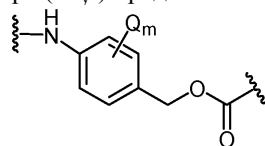
Схема 4



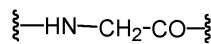
На схеме 4 Q означает $-C_1-C_8$ -алкил, $-C_2-C_8$ -алкенил, $-C_2-C_8$ -алкинил, $-O-(C_1-C_8$ -алкил), $-O-(C_2-C_8$ -алкенил), $-O-(C_2-C_8$ -алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m - целое число от 0 до 4; n равно 0 или 1; a p - целое число от 1 до 20. Радикалы алкил, алкенил и алкинил, по отдельности или в составе другой группы, необязательно могут быть замещенными.

В некоторых воплощениях группировки -D одинаковы. В другом воплощении группировки -D различны.

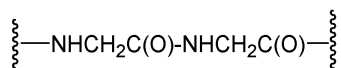
В одном аспекте звено спейсера ($-Y_v-$) представлено формулами (X)-(XII)



X



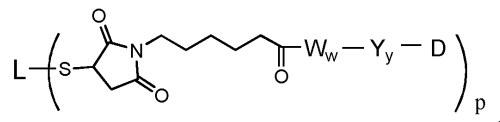
XI



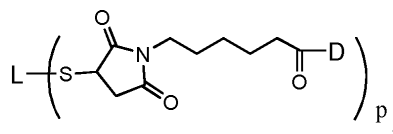
XII

где Q означает $-C_1-C_8$ -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), -галоген, -нитро или -циано; m - целое число от 0 до 4. Радикалы алкил, алкенил и алкинил, по отдельности или в составе другой группы, необязательно могут быть замещенными.

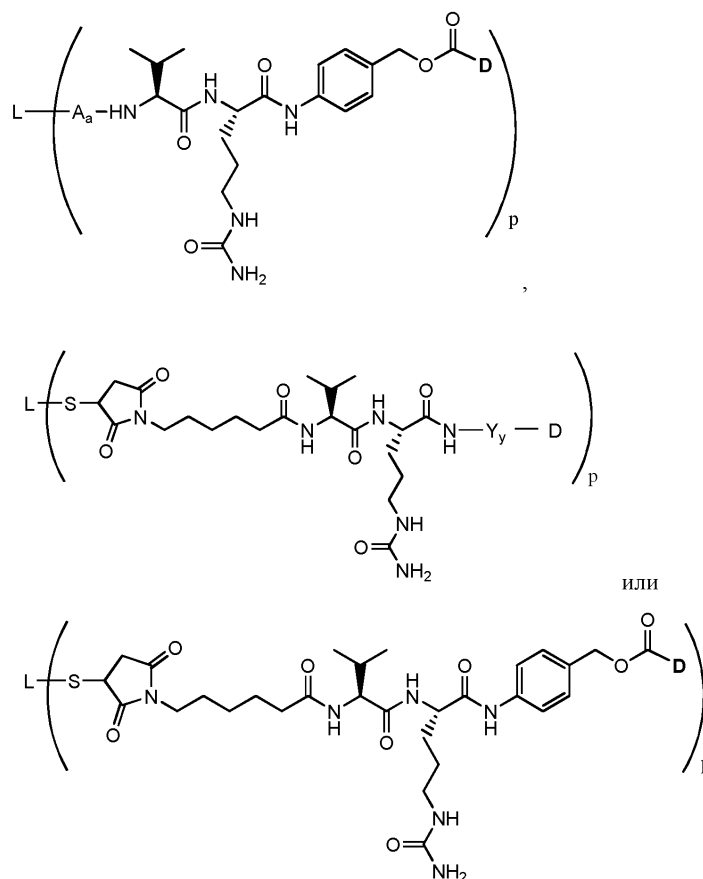
Воплощения формул I и II, содержащие конъюгаты антитело-лекарственное средство, могут включать



где w и u равны 0, 1 или 2,



где w и u равны 0,



IX. Звено лекарственного средства.

Звеном лекарственного средства (D) может быть любое цитотоксическое, цитостатическое или иммуномодулирующее (например, иммуносупрессивное) средство или препарат. D - это звено (молекула) лекарственного средства, содержащая атом, который может образовывать связь со звеном спейсера, с аминокислотным звеном, со звеном удлинителя или со звеном антитела. В некоторых воплощениях звено лекарственного средства D содержит атом азота, который может образовывать связь со звеном спейсера. В настоящем описании термины "звено лекарственного средства" и "молекула лекарственного средства" являются синонимами и применяются взаимозаменяемым образом.

Полезные классы цитотоксических или иммуномодулирующих средств включают, к примеру, анти-тубулиновые средства, вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК и алкилирующие средства.

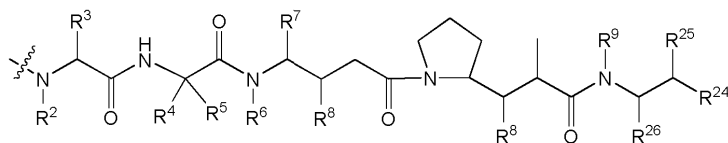
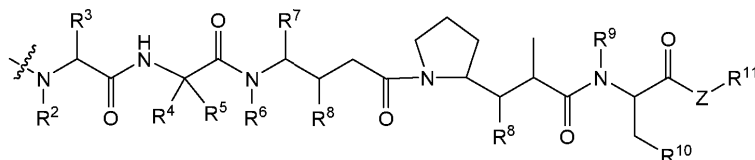
В некоторых воплощениях лекарственное средство представлено ауристатином типа ауристатина E (также известен как производное доластатина-10) или его производных. Ауристатин может представлять собой, к примеру, сложный эфир между ауристатином E и кетокислотой. Например, ауристатин E может быть подвергнут реакции с пара-ацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с получением AEB и AEVB, соответственно. Другие типичные ауристатины включают AFP, MMAF и MMAE. Синтез и структура типичных ауристатинов описаны в U.S. Patent Application Publication Nos. 2003-0083263, 2005-0238649 и 2005-0009751; International Patent Publication No. WO 04/010957, International Patent Publication No. WO 02/088172, и U.S. Patent Nos. 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; и 4,486,414, которые все включены сюда путем ссылки во всей полноте и на все случаи.

Показано, что ауристатины нарушают динамику микротрубочек и деление ядер и клеток и обладают противораковой активностью. Ауристатины связывают тубулин и могут оказывать цитотоксические или цитостатические эффекты на экспрессирующие 158P1D7 клетки. Имеется несколько различных методов анализа, известных в данной области, которые можно использовать для определения того, будет ли ауристатин или полученный конъюгат антитело-лекарственное средство оказывать цитостатическое или цитотоксическое действие на искомую линию клеток.

Методы определения того, будет ли соединение связываться с тубулином, известны в данной области. К примеру, см. Muller et al., Anal. Chem. 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995, 47: 965-976; и Hamel et al., Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(28): 17141-17149. Для целей настоящего изобретения можно определить относительное сродство соединения к тубулину. Некоторые предпочтительные ауристатины настоящего изобретения связывают тубулин со средством, составляю-

щим от 10 раз меньше (более слабое сродство), чем сродство связывания ММАЕ с тубулином, до 10 раз, 20 раз или даже в 100 раз выше (более высокое сродство), чем сродство связывания ММАЕ с тубулином.

В некоторых воплощениях -D означает ауристатин по формуле D_E или D_F:

D_ED_F

либо его фармацевтически приемлемую соль или сольват; где, независимо в каждом положении:

волнистая линия означает связь;

R² означает -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил или -C₂-C₂₀-алкинил;

R³ означает -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 означает -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 означает -H или -C₁-C₈-алкил; или же

R⁴ и R⁵ совместно образуют карбоциклическое кольцо по формуле -(CR^aR^b)_s-, где R^a и R^b независимо означают -H, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил, -C₂-C₂₀-алкинил или -карбоцикл, а s равно 2, 3, 4, 5 или 6;

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

R⁷ означает -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 независимо означает -H, -ОН, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил, -C₂-C₂₀-алкинил, -О-(C₁-C₂₀-алкил), -О-(C₂-C₂₀-алкенил), -О-(C₂-C₂₀-алкинил) или -карбоцикл;

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

R²⁴ означает -арил, -гетероцикл или -карбоцикл;

R²⁵ означает -H, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил, -C₂-C₂₀-алкинил, -карбоцикл, -О-(C₁-C₂₀-алкил), -О-(C₂-C₂₀-алкенил), -О-(C₂-C₂₀-алкинил) или OR¹⁸, где R¹⁸ означает -H, гидроксильную защитную группу или прямую связь, где OR¹⁸ означает =O;

R²⁶ означает -H, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил или -C₂-C₂₀-алкинил, -арил, -гетероцикл или -карбоцикл;

R¹⁰ означает -арил или -гетероцикл;

Z означает -O-, -S-, -NH- или -NR¹²-, где R¹² означает -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил или -C₂-C₂₀-алкинил;

R¹¹ означает -H, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил, -C₂-C₂₀-алкинил, -арил, -гетероцикл, -(R¹³O)_m-R¹⁴ или -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m - целое число от 1 до 1000;

R¹³ означает -C₂-C₂₀-алкилен, -C₂-C₂₀-алкенилен или -C₂-C₂₀-алкинилен;

R¹⁴ означает -H, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил или -C₂-C₂₀-алкинил;

R¹⁵ в каждом случае независимо означает -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₂₀-алкил, -(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀-алкенил или -(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀-алкинил;

R¹⁶ в каждом случае независимо означает -H, -C₁-C₂₀-алкил, -C₂-C₂₀-алкенил, -C₂-C₂₀-алкинил или -(CH₂)_n-COOH; и

n - целое число от 0 до 6;

причем радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл и гетероцикл, по отдельности или в составе другой группы, необязательно замещены.

Ауристатины по формуле D_E включают те, у которых радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл и гетероцикл являются незамещенными.

Ауристатинны по формуле D_E включают те, у которых группы R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ являются незамещенными, а группы R¹⁹, R²⁰ и R²¹ являются необязательно замещенными, как описано здесь.

Ауристатинны по формуле D_E включают те, у которых:

R² означает -C₁-C₈-алкил;

R³, R⁴ и R⁷ выбраны независимо из -H, -C₁-C₂₀-алкила, -C₂-C₂₀-алкенила, -C₂-C₂₀-алкинила, моноциклического C₃-C₆-карбоцикла, -C₁-C₂₀-алкилен(моноциклического C₃-C₆-карбоцикла), -C₂-C₂₀-алкенилен(моноциклического C₃-C₆-карбоцикла), -C₂-C₂₀-алкинилен(моноциклического C₃-C₆-карбоцикла), -C₆-C₁₀-арила, -C₁-C₂₀-алкилен(C₆-C₁₀-арила), -C₂-C₂₀-алкенилен(C₆-C₁₀-арила), -C₂-C₂₀-алкинилен(C₆-C₁₀-арила), -гетероцикла, -C₁-C₂₀-алкилен(гетероцикла), -C₂-C₂₀-алкенилен(гетероцикла) и -C₂-C₂₀-алкинилен(гетероцикла); причем радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, карбоцикл, арил и гетероцикл необязательно замещены;

R⁵ означает -H;

R⁶ означает -C₁-C₈-алкил;

каждый R⁸ независимо выбран из -OH, -O-(C₁-C₂₀-алкила), -O-(C₂-C₂₀-алкенила) и -O-(C₂-C₂₀-алкинила), причем радикалы алкил, алкенил и алкинил необязательно замещены;

R⁹ означает -H или -C₁-C₈-алкил;

R²⁴ означает необязательно замещенный -фенил;

R²⁵ означает -OR¹⁸, где R¹⁸ означает H, гидроксильную защитную группу или прямую связь, где OR¹⁸ означает =O;

R²⁶ выбран из -H, -C₁-C₂₀-алкила, -C₂-C₂₀-алкенила, -C₂-C₂₀-алкинила и -карбоцикла; причем радикалы алкил, алкенил, алкинил и карбоцикл необязательно замещены;

либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_E включают те, у которых:

R² означает метил;

R³ означает -H, -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил или -C₂-C₈-алкинил, причем радикалы алкил, алкенил и алкинил необязательно замещены;

R⁴ означает -H, -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил, -C₂-C₈-алкинил, моноциклический C₃-C₆-карбоцикл, -C₆-C₁₀-арил, -C₁-C₈-алкилен(C₆-C₁₀-арил), -C₂-C₈-алкенилен(C₆-C₁₀-арил), -C₂-C₈-алкинилен(C₆-C₁₀-арил), -C₁-C₈-алкилен (моноциклический C₃-C₆-карбоцикл), -C₂-C₈-алкенилен (моноциклический C₃-C₆-карбоцикл), -C₂-C₈-алкинилен(моноциклический C₃-C₆-карбоцикл); причем радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил и карбоцикл, по отдельности или в составе другой группы, необязательно замещены;

R⁵ означает -H;

R⁶ означает метил;

R⁷ означает -C₁-C₈-алкил, -C₂-C₈-алкенил или -C₂-C₈-алкинил;

каждый R⁸ означает метокси;

R⁹ означает -H или -C₁-C₈-алкил;

R²⁴ означает -фенил;

R²⁵ означает -OR¹⁸, где R¹⁸ означает -H, гидроксильную защитную группу или прямую связь, где OR¹⁸ означает =O;

R²⁶ означает метил;

либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_E включают те, у которых:

R² означает метил; R³ означает -H или C₁-C₃-алкил; R⁴ означает C₁-C₅-алкил; R⁵ означает -H; R⁶ означает метил; R⁷ означает изопропил или втор-бутил; R⁸ означает метокси; R⁹ означает -H или C₁-C₈-алкил; R²⁴ означает фенил; R²⁵ означает OR¹⁸, где R¹⁸ означает H, гидроксильную защитную группу или прямую связь, где OR¹⁸ означает =O; и R²⁶ означает метил; либо их фармацевтически приемлемые соли или сольваты.

Ауристатинны по формуле D_E включают те, у которых:

R² означает метил или C₁-C₃-алкил; R³ означает -H или C₁-C₃-алкил; R⁴ означает C₁-C₅-алкил; R⁵ означает -H; R⁶ означает C₁-C₃-алкил; R⁷ означает C₁-C₅-алкил; R⁸ означает C₁-C₃-алкокси; R⁹ означает -H или C₁-C₈-алкил; R²⁴ означает фенил; R²⁵ означает OR¹⁸, где R¹⁸ означает H, гидроксильную защитную группу или прямую связь, где OR¹⁸ означает =O; и R²⁶ означает C₁-C₃-алкил; либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых:

R² означает метил;

R³, R⁴ и R⁷ выбраны независимо из -H, -C₁-C₂₀-алкила, -C₂-C₂₀-алкенила, -C₂-C₂₀-алкинила, моноциклического C₃-C₆-карбоцикла, -C₁-C₂₀-алкилен(моноциклического C₃-C₆-карбоцикла), -C₂-C₂₀-алкенилен(моноциклического C₃-C₆-карбоцикла), -C₂-C₂₀-алкинилен(моноциклического C₃-C₆-карбоцикла), -C₆-C₁₀-арила, -C₁-C₂₀-алкилен(C₆-C₁₀-арила), -C₂-C₂₀-алкенилен(C₆-C₁₀-арила), -C₂-C₂₀-алкинилен(C₆-C₁₀-арила), -гетероцикла, -C₁-C₂₀-алкилен(гетероцикла), -C₂-C₂₀-алкенилен(гетероцикла) и -C₂-C₂₀-алкинилен(гетероцикла); причем радикалы алкил, алкенил, ал-

кинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, карбоцикл, арил и гетероцикл, по отдельности или в составе другой группы, необязательно замещены;

R^5 означает -H;

R^6 означает метил;

каждый R^8 означает метокси;

R^9 означает -H, $-C_1-C_{20}$ -алкил, $-C_2-C_{20}$ -алкенил или $-C_2-C_{20}$ -алкинил; причем радикалы алкил, алкенил и алкинил необязательно замещены;

R^{10} означает необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероцикл;

Z означает -O-, -S-, -NH- или $-NR^{12}$ -, где R^{12} означает $-C_1-C_{20}$ -алкил, $-C_2-C_{20}$ -алкенил или $-C_2-C_{20}$ -алкинил, каждый из которых необязательно замещен;

R^{11} означает -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 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, причем радикалы алкил, алкенил, алкинил, арил и гетероцикл необязательно замещены;

m - целое число от 1 до 1000 либо m=0;

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

R^{14} означает -H, $-C_1-C_{20}$ -алкил, $-C_2-C_{20}$ -алкенил или $-C_2-C_{20}$ -алкинил, причем радикалы алкил, алкенил и алкинил необязательно замещены;

R^{15} в каждом случае независимо означает -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, причем радикалы алкил, алкенил и алкинил необязательно замещены;

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

n - целое число от 0 до 6;

либо их фармацевтически приемлемые соли.

В некоторых из этих воплощений R^{10} означает необязательно замещенный фенил.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у 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} такие, как описано здесь.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен алкинилен, арил, карбоцикл и гетероцикл являются незамещенными.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых:

R^2 означает $-C_1-C_3$ -алкил; R^3 означает -H или $-C_1-C_3$ -алкил; R^4 означает $-C_1-C_5$ -алкил; R^5 означает -H; R^6 означает $-C_1-C_3$ -алкил; R^7 означает $-C_1-C_5$ -алкил; R^8 означает $-C_1-C_3$ -алкокси; R^9 означает -H или $-C_1-C_8$ -алкил; R^{10} означает необязательно замещенный фенил; Z означает O, S или NH; а R^{11} уже определен здесь; либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых:

R^2 означает метил; R^3 означает -H или $-C_1-C_3$ -алкил; R^4 означает $-C_1-C_5$ -алкил; R^5 означает -H; R^6 означает метил; R^7 означает изопропил или втор-бутил; R^8 означает метокси; R^9 означает -H или $-C_1-C_8$ -алкил; R^{10} означает необязательно замещенный фенил; Z означает -O-, -S- или -NH-; а R^{11} уже определен здесь; либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых:

R^2 означает метил; R^3 означает -H или $-C_1-C_3$ -алкил; R^4 означает $-C_1-C_5$ -алкил; R^5 означает -H; R^6 означает метил; R^7 означает изопропил или втор-бутил; R^8 означает метокси; R^9 означает -H или $-C_1-C_8$ -алкил; R^{10} означает фенил; Z означает -O- или -NH-; а R^{11} уже определен здесь, предпочтительно водород; либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых:

R^2 означает $-C_1-C_3$ -алкил; R^3 означает -H или $-C_1-C_3$ -алкил; R^4 означает $-C_1-C_5$ -алкил; R^5 означает -H; R^6 означает $-C_1-C_3$ -алкил; R^7 означает $-C_1-C_5$ -алкил; R^8 означает $-C_1-C_3$ -алкокси; R^9 означает -H или $-C_1-C_8$ -алкил; R^{10} означает фенил; Z означает -O- или -NH-; а R^{11} уже определен здесь, предпочтительно водород; либо их фармацевтически приемлемые соли.

Ауристатинны по формуле D_E или D_F включают те, у которых R^3 , R^4 и R^7 независимо означают изопропил или втор-бутил; а R^5 означает -H. В типичном воплощении R^3 и R^4 каждый означает изопропил, R^5 означает H, а R^7 означает втор-бутил. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатинны по формуле D_E или D_F включают те, у которых R^2 и R^6 каждый означает метил, а R^9 означает H. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатинны по формуле D_E или D_F включают те, у которых R^8 в каждом случае означает $-OCH_3$. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатинны по формуле D_E или D_F включают те, у которых R^3 и R^4 каждый означает изопропил, R^2 и R^6 каждый означает метил, R^5 означает H, R^7 означает втор-бутил, R^8 в каждом случае означает $-OCH_3$, а R^9 означает H. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатинны по формуле D_F включают те, у которых Z означает -O- или -NH-. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатины по формуле D_F включают те, у которых R¹⁰ означает арил. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатины по формуле D_F включают те, у которых R¹⁰ означает -фенил. Остальные заместители уже определены здесь.

Ауристатины по формуле D_F включают те, у которых Z означает -O-, а R¹¹ означает H, метил или трет-бутил. Остальные заместители уже определены здесь.

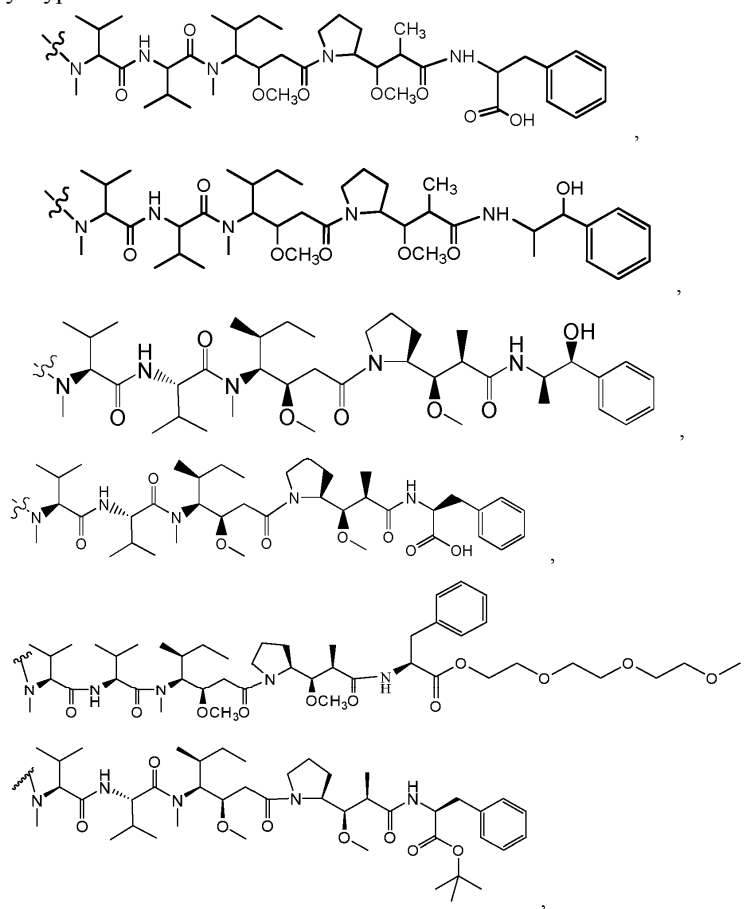
Ауристатины по формуле D_F включают те, у которых, если Z означает -NH, то R¹¹ означает -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, где R¹⁵ означает -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, а R¹⁶ означает -C₁-C₈-алкил или -(CH₂)_n-COOH. Остальные заместители уже определены выше.

Ауристатины по формуле D_F включают те, у которых, если Z означает -NH, то R¹¹ означает -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, где R¹⁵ означает -(CH₂)_n-SO₃H. Остальные заместители уже определены выше.

В предпочтительных воплощениях, если D означает ауристин по формуле D_E, то w - целое число от 1 до 12, предпочтительно от 2 до 12, у равно 1 или 2, а а предпочтительно равно 1.

В некоторых воплощениях, если D означает ауристин по формуле D_F, то а равно 1, а w и у равны 0.

Типичные звенья лекарственного средства (-D) включают звенья лекарственного средства, имеющие следующие структуры:

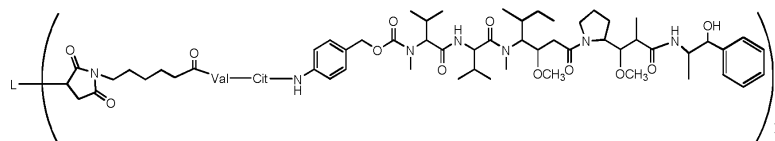


В одном аспекте к звену лекарственного средства по R¹¹ могут присоединяться гидрофильные группы, такие, без ограничения, как сложные эфиры триэтиленгликоля (TEG). Не придерживаясь какой-либо теории, гидрофильные группы способствуют интернализации и препятствуют агрегации звена лекарственного средства.

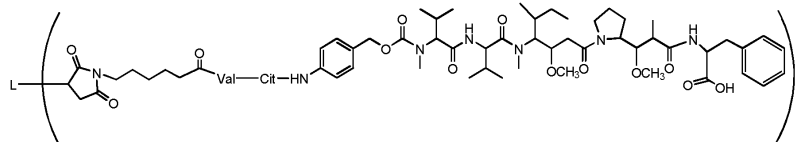
- 38 -

Типичные конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующие структуры, где "L" или "mAb-S-" означает приведенное здесь mAb к 158P1D7, обозначенное Ha15-10ac12:

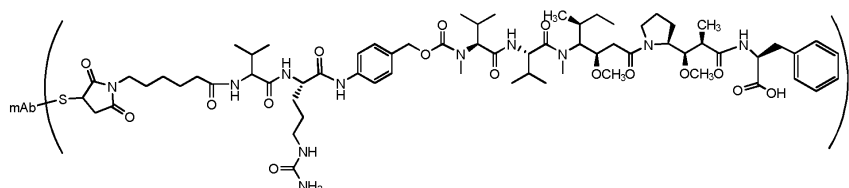
L-MC-vc-PAB-MMAE:



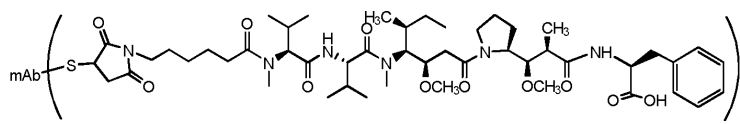
L-MC-vc-PAB-MMAF:



или



L-MC-MMAF:



либо их фармацевтически приемлемые соли.

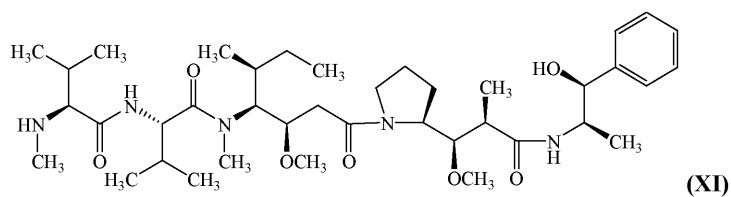
В некоторых воплощениях звеном лекарственного средства служит калихеамицин, камптотецин, майтансиноид или антрациклин. В некоторых воплощениях лекарственным средством служит таксан, ингибитор топоизомеразы, алкалоид барвинка и прочее.

В некоторых типичных воплощениях подходящие цитотоксические средства включают, к примеру, вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, ендины и лекситропсины, соединения СВИ; также см. U.S. Patent No. 6,130,237), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксель и доцетаксель), пурамицины и алкалоиды барвинка. Другие цитотоксические средства включают, к примеру, СС-1065, СН-38, топотекан, морфолино-доксорубин, ризоксин, цианоморфолино-доксорубин, эхиномицин, комбретастатин, нетропсин, эпотион А и В, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтансиноиды, дискодермолид, элевтеробин и митоксантрон.

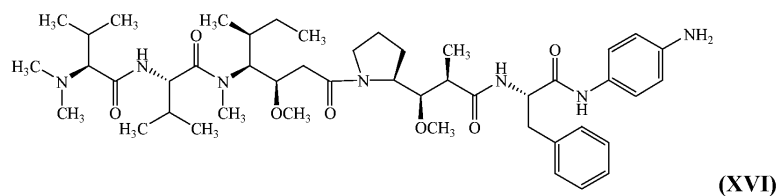
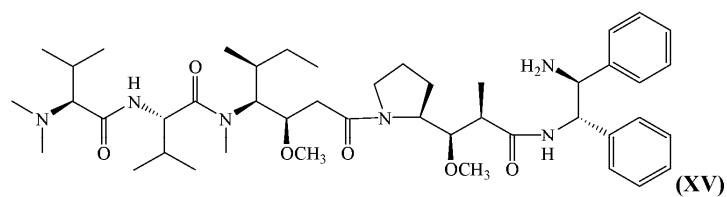
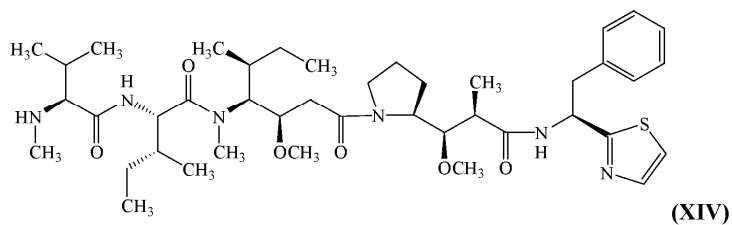
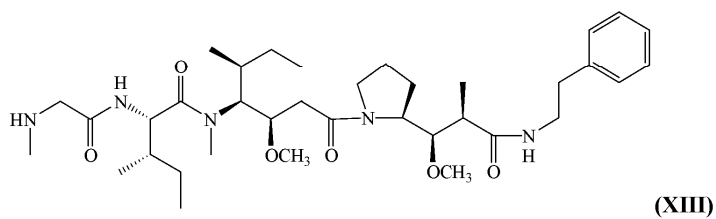
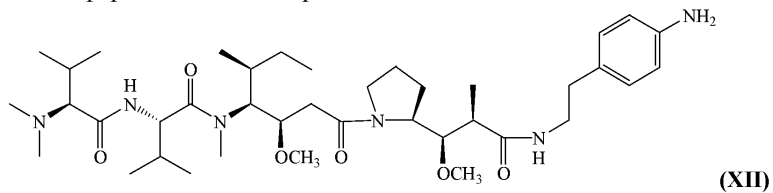
В некоторых воплощениях лекарственное средство представлен антитубулиновым средством. Примеры антитубулиновых средств включают ауристатины, таксаны (например, Taxol® (паклитаксель), Taxotere® (доцетаксель)), T67 (Tularik) и алкалоиды барвинка (например, винкрестин, винбластин, виндезин и винорелбин). Другие антитубулиновые средства включают, к примеру, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотион А и В), нокодазол, колхицин и колчимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтансиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элевтеробин.

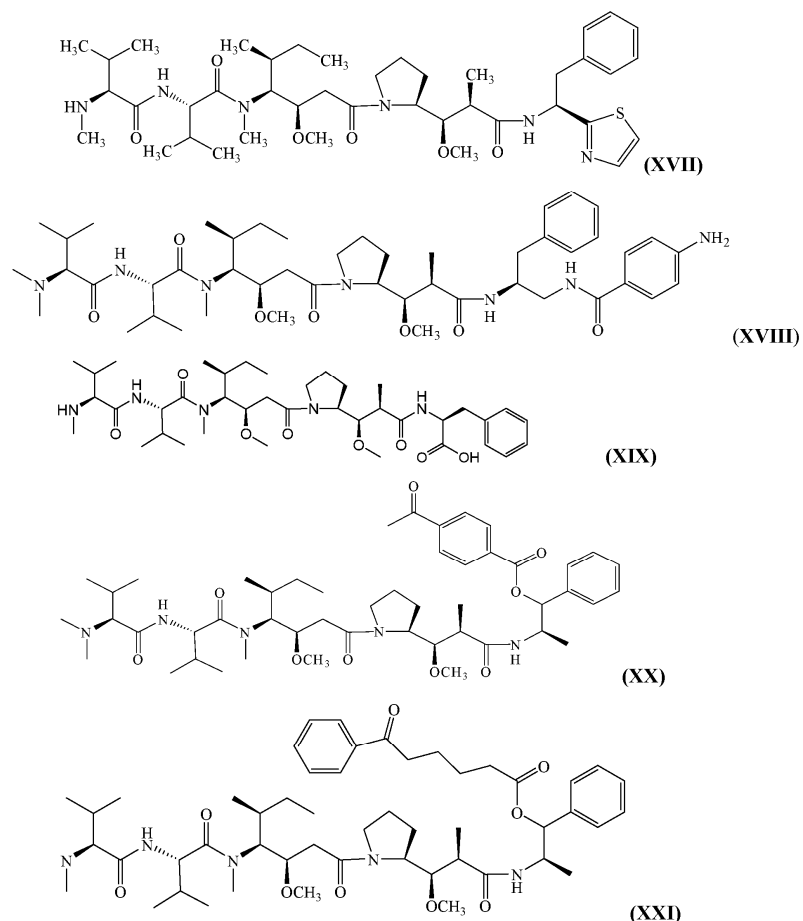
В некоторых воплощениях цитотоксическим средством служит майтансиноид, из отдельной группы антитубулиновых средств. Например, в определенных воплощениях майтансиноид представлен майтансином или DM-1 (ImmunoGen, Inc.; также см. Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

В некоторых воплощениях цитотоксическим или цитостатическим средством служит доластатин. В некоторых воплощениях цитотоксическое или цитостатическое вещество относится к классу ауристатинов. Так, в одном конкретном воплощении цитотоксическим или цитостатическим средством служит MMAE (формула XI). В другом конкретном воплощении цитотоксическим или цитостатическим средством служит AFP (формула XVI).



В некоторых воплощениях цитотоксическим или цитостатическим средством служит соединение формулы XII-XXI или его фармацевтически приемлемая соль:





Х. Нагруженность лекарственным средством.

Нагруженность лекарственным средством выражается числом p и представляет среднее число молекул лекарственного средства на 1 антитело в молекуле. Нагруженность лекарственным средством может составлять от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на 1 антитело. Конъюгаты ADC по изобретению включают совокупность антител, конъюгированных с целым рядом молекул лекарственного средства, от 1 до 20. Среднее число молекул лекарственного средства на 1 антитело в препаратах ADC при реакции конъюгирования можно установить стандартными методами типа масс-спектропии и ELISA. Также можно определить количественное распределение конъюгатов ADC по значениям p . В некоторых случаях можно проводить разделение, очистку и характеристику однородных конъюгатов ADC с определенным значением p от конъюгатов ADC с другой нагруженностью лекарственным средством такими методами, как электрофорез.

У некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство значение p может быть ограничено количеством мест прикрепления на антителе. Например, если местом прикрепления служит тиол цистеина, как в приведенных выше типичных воплощениях, то антитело может содержать только одну или же несколько тиоловых групп цистеина, либо оно может содержать только одну или же несколько достаточно реакционноспособных тиоловых групп цистеина, по которым может присоединяться линкер. В некоторых воплощениях более высокая нагруженность лекарственным средством, например $p > 5$, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости у некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство. В некоторых воплощениях нагруженность лекарственным средством у ADC по изобретению составляет от 1 до 8; от 2 до 6; от 3 до 5; от 3 до 4; от 3,1 до 3,9; от 3,2 до 3,8; от 3,2 до 3,7; от 3,2 до 3,6; от 3,3 до 3,8; или от 3,3 до 3,7. Так, было показано, что у некоторых ADCs оптимальное количество молекул лекарственного средства на 1 антитело может быть менее 8 или может составлять от 2 до 5. См. US 2005-0238649 A1 (включена сюда путем ссылки во всей полноте).

В некоторых воплощениях при реакции конъюгирования с антителом конъюгируется меньше молекул лекарственного средства, чем теоретический максимум. Например, антитело может содержать такие остатки лизина, которые не реагируют с промежуточным продуктом лекарственное средство-линкер или с линкерным реагентом, как изложено ниже. Вообще антитела содержат немного свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут связываться с молекулой лекарственного средства; а большинство тиоловых групп цистеина в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. В некоторых воплощениях для получения реакционноспособных тиоловых групп цистеина антитело можно подвергнуть восстановлению с помощью восстановительного реагента типа дитиотреитола (DTT) или трикарбонилэтилфосфина (TCEP) в частично или полностью восстановительных условиях. В некоторых

воплощениях антитело подвергается денатурирующим условиям, чтобы выявить реакционноспособные нуклеофильные группы типа лизина или цистеина.

Нагруженность (соотношение лекарственное средство/антитело) у ADC можно контролировать различными способами, например путем: (i) ограничения молярного избытка промежуточного продукта лекарственное средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгирования, (iii) частичного ограничения восстановительных условий для модификации тиоловых групп цистеина, (iv) изменения рекомбинантными методами аминокислотной последовательности антитела с тем, чтобы модифицировать число и расположение остатков цистеина для контроля за количеством и/или местоположением прикрепления линкер-лекарственное средство (типа получения тιο-Mab или тιο-Fab, как изложено здесь и в WO 2006/034488 (включено сюда путем ссылки во всей полноте)).

Следует иметь в виду, что если с промежуточным продуктом лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, а затем и с реагентом для молекул лекарственного средства реагирует больше чем одна нуклеофильная группа, то полученный продукт будет смесью конъюгатов ADC с распределением по одной или больше молекул лекарственного средства, присоединенных к антителу. Среднее число молекул лекарственного средства на 1 антитело в смеси можно рассчитать двойным методом ELISA, специфичным для антитела и специфичным для лекарственного средства. В смеси можно идентифицировать индивидуальные молекулы ADC методом масс-спектропии и разделить их методом HPLC, например гидрофобной хроматографии (например, см. Hamblett, K.J. et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and 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 некоторых воплощениях из конъюгационной смеси можно выделить однородные ADC с одинаковым значением нагруженности методом электрофореза или хроматографии.

XI. Методы определения цитотоксического эффекта конъюгатов ADC.

Методы определения того, будет ли лекарственное средство или конъюгат антитело-лекарственное средство оказывать цитостатическое и/или цитотоксическое действие на клетки, известны. В общем, цитотоксическая или цитостатическая активность конъюгата антитело-лекарственное средство может быть измерена следующим образом: клетки млекопитающих, экспрессирующие заданный белок, подвергаются воздействию конъюгата антитело-лекарственное средство в среде для клеточной культуры; клетки культивируются на протяжении от 6 ч до 5 дней; и измеряется жизнеспособность клеток. Клеточные методы анализа *in vitro* могут применяться для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспазы) у конъюгата антитело-лекарственное средство.

Для определения того, будет ли конъюгат антитело-лекарственное средство оказывать цитостатическое действие, можно использовать метод включения тимидина. Например, раковые клетки, экспрессирующие антиген-мишень, можно культивировать при плотности 5000 клеток на лунку в 96-луночном планшете в течение 72 ч и подвергнуть воздействию 0,5 μCi ^3H -тимидина в течение последних 8 ч этого 72-часового периода. Включение ^3H -тимидина в клетки культуры измеряется в присутствии и в отсутствие конъюгата антитело-лекарственное средство.

Для определения цитотоксичности можно измерять некроз или апоптоз (запрограммированную смерть клеток). Некроз обычно сопровождается повышением проницаемости плазматической мембраны, набуханием клеток и разрывом плазматической мембраны. Апоптоз обычно характеризуется образованием мембранных пузырьков (блеббинг), конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Определение любого из этих эффектов на раковых клетках означает, что конъюгат антитело-лекарственное средство применим при лечении рака.

Жизнеспособность клеток можно измерять путем определения на клетках поглощения такого красителя, как нейтральный красный, трипановый синий или AlamarTM Blue (например, см. Page et al., 1993, *Int. J. Oncology* 3:473-476). При таком анализе клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, затем клетки отмывают и спектрофотометрически измеряют оставшийся краситель, что отражает поглощение красителя клетками. Для измерения цитотоксичности также можно использовать связывающийся с белками краситель сульфородамин В (SRB) (Skehan et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

С другой стороны, при количественном колориметрическом определении жизнеспособности и пролиферации клеток млекопитающих применяются соли тетразолия типа МТТ, которые выявляют живые, но не мертвые клетки (например, см. Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

Апоптоз можно количественно определять, к примеру, по фрагментации ДНК. Существуют коммерческие фотометрические методы количественного определения *in vitro* фрагментации ДНК. Примеры таких методов, включая TUNEL (в котором детектируется включение меченых нуклеотидов во фрагментированную ДНК) и методы на основе ELISA, приведены в Biochemica, 1999, по. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Апоптоз также можно определять по морфологическим изменениям в клетках.

Например, как и при некрозе, можно определять нарушение целостности плазматической мембраны по поглощению некоторых красителей (например, флуоресцентных красителей, таких, к примеру, как акридин оранж или бромид этидия). Описан метод измерения количества апоптозных клеток в Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Также можно помечать клетки красителем на ДНК (к примеру, акридиновым оранж, бромидом этидия или йодидом пропидия) и отмечать конденсацию хроматина в клетках и скопление его вдоль внутренней ядерной мембраны. Другие морфологические изменения, которые можно измерять для определения апоптоза, включают, например, конденсацию цитоплазмы, усиление блеббинга мембран и сморщивание клеток.

Наличие апоптозных клеток может измерять как на фиксированных, так и на "свободно плавающих" компартментах культур. Например, можно собрать оба компартмента путем удаления супернатанта, трипсинизовать прикрепленные клетки, объединить препараты после промывки их центрифугированием (например, 10 мин при 2000 об/мин) и детектировать апоптоз (например, по фрагментации ДНК) (например, см. Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Действие терапевтических композиций против 158P1D7 можно тестировать *in vivo* на подходящих моделях у животных. Например, можно использовать ксенотенные модели рака, в которых эксплантаты или пассированные ксенотрансплантаты раковых тканей вводятся животным с ослабленным иммунитетом, как-то мышам nude или SCID (Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). Например, в PCT Patent Application WO 98/16628 и U.S. Patent 6,107,540 описаны различные модели ксенотрансплантатов рака простаты человека, способные воспроизводить развитие первичных опухолей, микрометастазов, и формирование остеобластных метастазов, характерных для поздней стадии заболевания. Эффективность можно прогнозировать такими методами, в которых измеряется ингибирование образования опухолей, регрессия опухолей или метастазирование и пр.

При оценке терапевтических композиций применяются методы *in vivo*, в которых определяется усиление апоптоза. В одном воплощении ксенотрансплантаты из несущих опухоли мышей, обработанных терапевтической композицией, можно исследовать на наличие очагов апоптоза и сравнить их с необработанным контрольным мышам с ксенотрансплантатами. Степень, в которой очаги апоптоза обнаруживаются в опухолях у обработанных мышей, служит признаком терапевтической эффективности композиции.

Терапевтические композиции, используемые при практическом применении вышеприведенных методов, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций, содержащих подходящие носители для требуемого способа доставки.

Подходящие носители включают любые материалы, которые в сочетании с терапевтической композицией сохраняют противоопухолевую функцию терапевтической композиции и в общем не реагируют с иммунной системой пациента. Примеры их включают, без ограничения, любые из целого ряда стандартных фармацевтических носителей типа стерильных солевых растворов с фосфатным буфером, бактериостатической воды и т.п. (вообще см. Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Лекарственные формы можно солиubilизировать и вводить любым способом, пригодным для доставки терапевтической композиции к месту опухоли. Потенциально эффективные способы введения включают, без ограничения, внутривенное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриопухолевое, внутрикожное, внутриорганное, ортотопическое и др. Предпочтительная форма для внутривенного введения включает терапевтическую композицию в растворе бактериостатической воды с консервантом, стерильной воды без консерванта и/или разведенную в поливинилхлоридных или полиэтиленовых мешочках, содержащих 0,9% стерильного хлорида натрия для инъекций, USP. Терапевтические белковые препараты можно лиофилизировать и хранить в виде стерильных порошков, предпочтительно под вакуумом, а затем восстанавливать в бактериостатической воде (содержащей, к примеру, консервант бензиловый спирт) или в стерильной воде перед введением.

Дозировки и способы введения при лечении раковых заболеваний с использованием вышеприведенных способов будут зависеть от способа и ракового заболевания и вообще зависят от ряда других факторов, учитываемых на практике.

XII. Лечение рака, экспрессирующего 158P1D7.

Идентификация 158P1D7 в качестве белка, который в норме экспрессируется в ограниченном наборе тканей, но также экспрессируется при таких раковых заболеваниях, которые перечислены в табл. I, открывает целый ряд терапевтических подходов к лечению таких раковых заболеваний.

Следует отметить, что адресная противоопухолевая терапия бывает полезной даже тогда, когда искомый белок экспрессируется в нормальных тканях, даже в нормальных тканях жизненно важных органов. Жизненно важные органы - такие органы, которые необходимы для поддержания жизни, как-то сердце или толстая кишка. Не жизненно важные органы - такие органы, после удаления которых индивид еще в состоянии выжить. Примерами не жизненно важных органов являются яичники, молочная железа и предстательная железа.

Экспрессия искомого белка в нормальной ткани, даже в жизненно важной нормальной ткани, не умаляет полезность направляющего вещества для белка в качестве терапевтического средства для неко-

торых опухолей, в которых этот белок подвергается суперэкспрессии. Например, экспрессия в жизненно важных органах сама по себе не приносит вреда. К тому же органы, считающиеся необязательными, как-то предстательная железа и яичники, могут быть удалены, не вызывая смертности. Наконец, некоторые жизненно важные органы не зависят от нормальной экспрессии в органе из-за его иммунопривилегированности. Иммунопривилегированными органами являются такие органы, которые защищены от крови гематоорганным барьером и поэтому недоступны для иммунотерапии. Примерами иммунопривилегированных органов являются мозг и яички.

Соответственно, терапевтические подходы, которые ингибируют активность белка 158P1D7, полезны для пациентов, страдающих от рака, экспрессирующего 158P1D7. Эти терапевтические подходы в общем делятся на три класса. Первый класс модулирует функцию 158P1D7, так как она связана с ростом опухолевых клеток, что приводит к ингибированию или замедлению роста опухолевых клеток или вызывает их гибель. Второй класс включает различные способы ингибирования связывания или ассоциации белка 158P1D7 со своим партнером по связыванию или с другими белками. Третий класс включает различные методы ингибирования транскрипции гена 158P1D7 или трансляции мРНК 158P1D7.

Соответственно, больных раком можно обследовать на наличие и уровень экспрессии 158P1D7, предпочтительно с помощью иммуногистохимической оценки опухолевой ткани, количественной визуализации 158P1D7 или других методов, которые надежно указывают на наличие и степень экспрессии 158P1D7. Иммуногистохимический анализ биоптатов опухоли или хирургических образцов является предпочтительным для этой цели. Методы иммуногистохимического анализа опухолевых тканей хорошо известны в данной области.

XIII. 158P1D7 как мишень для терапии на основе антител.

158P1D7 является привлекательной мишенью для терапевтических стратегий на основе антител. Известны различные стратегии на основе антител для таргетинга как внеклеточных, так и внутриклеточных молекул (например, опосредованное комплементом и ADCC уничтожение, а также применение интрател). Поскольку 158P1D7 экспрессируется в раковых клетках различных линий относительно соответствующих нормальных клеток, то применяется системное введение таких 158P1D7-иммунореактивных композиций, которые проявляют высокую чувствительность без токсичных, неспецифических и/или нецелевых эффектов, вызванных связыванием иммунореактивной композиции с нецелевыми органами и тканями. Антитела, специфически реагирующие с доменами 158P1D7, применимы для системного лечения экспрессирующих 158P1D7 видов рака, предпочтительно в виде конъюгатов антитело-лекарственное средство (т.е. ADCs), а именно конъюгатов с токсином или терапевтическим средством.

Специалистам в данной области известно, что антитела могут применяться для специфического таргетинга и связывания таких иммуногенных молекул, как иммуногенная область в последовательности 158P1D7, представленной на фиг. 1. Кроме того, специалистам известно, что конъюгирование антител с цитотоксическими средствами является обычным делом (например, см. Slevers et al., Blood 93(11): 3678-3684 (1999)). При доставке цитотоксических и/или терапевтических средств непосредственно в клетки, как-то при конъюгации их с антителами, специфичными к молекуле, экспрессируемой в этих клетках (например, 158P1D7), цитотоксическое средство будет оказывать свое известное биологическое действие (т.е. цитотоксичность) на эти клетки.

Известны самые разнообразные композиции и способы применения конъюгатов антител с цитотоксическими средствами для уничтожения клеток. В контексте рака, типичные способы включают введение млекопитающему с опухолью биологически эффективного количества конъюгата, содержащего выбранное цитотоксическое и/или терапевтическое средство, соединенное с адресным средством (например, mAb к 158P1D7, предпочтительно Ha15-10ac12), связывающимся с антигеном (например, 158P1D7), который экспрессируется, доступен для связывания или локализован на поверхности клеток. Типичным воплощением является способ доставки цитотоксического и/или терапевтического средства к клеткам, экспрессирующим 158P1D7, который включает конъюгирование цитотоксического средства с антителом, связывающимся иммуноспецифически с эпитопом 158P1D7, и воздействие на клетки конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC). Другим типичным воплощением является способ лечения индивидов с подозрением на метастазирующий рак, который включает стадию парентерального введения данному индивиду фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела, конъюгированного с цитотоксическим и/или терапевтическим средством.

Иммунотерапия рака с помощью антител к 158P1D7 может проводиться в соответствии с различными подходами, которые успешно применялись при лечении других видов рака, в том числе, но без ограничения, рака толстой кишки (Arlén et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138), множественной миеломы (Ozaki et al., 1997, Blood 90: 3179-3186, Tsunenari et al., 1997, Blood 90: 2437-2444), рака желудка (Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), В-клеточной лимфомы (Funakoshi et al., 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), лейкемии (Zhong et al., 1996, Leuk. Res. 20:581-589), колоректального рака (Moun et al., 1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders et al., 1995, Cancer Res. 55: 4398-4403) и рака молочной железы (Shepard et al., 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127). Некоторые терапевтические подходы включают конъюгирование голого антитела с токсином или радиоактивным изотопом, как-то конъюгирование ^{91}Y или ^{131}I с антителами против CD20 (например, Zevalin™, IDEC Pharmaceuticals

Corp., или Bexxar™, Coulter Pharmaceuticals), соответственно, в то время как другие включают совместное введение антител и других терапевтических средств, как-то Herceptin™ (трастузумаб) с паклитаксолом (Genentech, Inc.). В предпочтительном воплощении антитела должны быть конъюгированы с цитотоксическим средством, см. выше, предпочтительно производным ауристатина под названием MMAE (Seattle Genetics).

Хотя терапия антителами к 158P1D7 применима для всех стадий рака, она может быть особенно уместной при запущенном или метастатическом раке. Лечение с применением терапии антителами по изобретению показано для тех пациентов, которые уже получали один или несколько курсов химиотерапии. С другой стороны, терапия антителами по изобретению комбинируется с химиотерапией или лучевой терапией для тех пациентов, которые не получали химиотерапии. Кроме того, терапия антителами может способствовать снижению дозы при сопутствующей химиотерапии, особенно для тех пациентов, которые очень плохо переносят токсичность химиотерапевтического средства. В работах Fan et al. (Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Prewett et al. (Int. J. Oncol. 9:217-224, 1996) и Hancock et al. (Cancer Res. 51:4575-4580, 1991) описано применение различных антител вместе с химиотерапевтическими средствами.

Соответственно, предпочтительными моноклональными антителами при использовании в терапевтических способах по изобретению являются те, которые являются полностью человеческими или же специфически связываются с искомым антигеном 158P1D7 с высоким сродством. Хотя конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению применимы для лечения таких раковых заболеваний, при которых экспрессируется 158P1D7, однако конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению могут быть особенно терапевтически полезными при лечении рака мочевого пузыря.

XIV. Коктейли с ADC к 158P1D7.

Терапевтические способы изобретения предусматривают введение отдельных ADCs к 158P1D7, а также комбинаций или коктейлей из различных mAbs (т.е. mAbs к 158P1D7 или mAbs, связывающихся с другим белком). Такие коктейли из mAb могут иметь определенные преимущества, так они содержат такие mAbs, которые направлены на разные эпитопы, используют различные эффекторные механизмы или в них сочетаются непосредственно цитотоксические mAbs с такими mAbs, которые зависят от иммуноэффекторной функциональности. Такие сочетания mAbs могут обладать синергическим терапевтическим действием. Кроме того, mAbs к 158P1D7 можно вводить одновременно с другими терапевтическими средствами, в том числе, но без ограничения, различными химиотерапевтическими и биологическими средствами, блокаторами андрогенов, иммуномодуляторами (например, IL-2, GM-CSF), хирургией или радиацией. В предпочтительном воплощении mAbs к 158P1D7 вводятся в конъюгированном виде.

Лекарственные формы с ADC к 158P1D7 вводятся любым способом, пригодным для доставки антител к опухолевым клеткам. Способы введения включают, без ограничения, внутривенное, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутримышечное и др. Лечение в общем включает неоднократное введение лекарственного средства ADC к 158P1D7 приемлемым способом введения типа внутривенных инъекций (IV), как правило, в диапазоне доз, без ограничения, 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 массы тела. В общем, дозы в диапазоне 10-1000 мг mAb в неделю являются эффективными и хорошо переносятся.

На основании клинического опыта с Herceptin® (трастузумаб) при лечении метастатического рака молочной железы, приемлемый режим дозирования составляет начальная ударная доза примерно в 4 мг/кг веса тела пациента внутривенно с последующей еженедельной дозировкой препарата mAb примерно в 2 мг/кг внутривенно. Предпочтительно, начальная ударная доза вводится в виде 90-минутной инфузии или больше. Периодическая поддерживающая доза вводится в виде 30-минутной инфузии или больше при условии, что начальная доза хорошо переносилась. Как известно специалистам в данной области, на идеальную схему дозирования в каждом конкретном случае могут оказывать влияние различные факторы. Такие факторы включают, к примеру, сродство связывания и время полужизни используемых mAbs, степень экспрессии 158P1D7 у пациента, уровень циркулирующего отделившегося от клетки антигена 158P1D7, желательный стационарный уровень концентрации антител, частоту лечения и влияние химиотерапевтических или других средств, используемых в комбинации со способом лечения по изобретению, а также состояние здоровья данного пациента.

Необязательно, пациентов следует обследовать на уровень 158P1D7 в данном образце (например, уровень циркулирующего антигена 158P1D7 и/или экспрессирующих 158P1D7 клеток), что должно способствовать определению наиболее эффективного режима дозирования и т.д. Такие обследования также используются в целях мониторинга на всем протяжении терапии и полезны для оценки терапевтического успеха в сочетании с оценкой других параметров (например, цитологии мочи и/или уровня иммунцитов при терапии рака мочевого пузыря, или же, по аналогии, уровня PSA в сыворотке крови при лечении рака простаты).

Предметом настоящего изобретения является получение таких ADCs к 158P1D7, которые ингибируют или замедляют рост опухолевых клеток, экспрессирующих 158P1D7. Другой задачей изобретения является получение способов ингибирования ангиогенеза и других биологических функций и тем самым

ослабления роста опухолей у млекопитающих, предпочтительно человека, с помощью таких ADCs к 158P1D7, в частности, с помощью таких ADCs к 158P1D7 в сочетании с другими лекарственными средствами или иммунологически активными процедурами.

XV. Комбинированная терапия.

В одном воплощении наблюдается синергизм при лечении опухолей, в том числе опухолей у человека, с помощью ADCs к 158P1D7 в сочетании с химиотерапевтическими средствами или облучением либо их комбинацией. Иными словами, ингибирование роста опухолей под действием ADCs к 158P1D7 усиливается больше, чем ожидается, при комбинировании с химиотерапевтическими средствами или облучением либо их комбинацией. Синергизм может проявляться, к примеру, большим ингибированием роста опухолей при комбинированной терапии, чем можно было бы ожидать при лечении одними лишь ADCs к 158P1D7, или аддитивным эффектом лечения с помощью ADCs к 158P1D7 и химиотерапевтическим средством или облучением. Предпочтительно синергизм проявляться ремиссией рака тогда, когда ремиссия не ожидается при лечении одними ADCs к 158P1D7 или при лечении с использованием аддитивной комбинации ADC к 158P1D7 и химиотерапевтического средства или облучения.

Способ ингибирования роста опухолевых клеток с помощью ADC к 158P1D7 в комбинации с химиотерапией или облучением или тем и другим включает введение ADC к 158P1D7 до, во время или после начала химиотерапии или лучевой терапии, а также при любой комбинации их (т.е. до и во время, до и после, во время и после или же до, во время и после начала химиотерапии и/или лучевой терапии). Например, ADC к 158P1D7 обычно вводятся от 1 до 60 дней, предпочтительно от 3 до 40 дней, более предпочтительно от 5 до 12 дней до начала лучевой терапии и/или химиотерапии. Однако, в зависимости от методики лечения и конкретных потребностей пациента, способ выполняется таким образом, чтобы обеспечить наиболее эффективное лечение и в конечном счете продлить жизнь пациента.

Введение химиотерапевтических средств может осуществляться различными способами, включая системное введение парентеральным и энтеральным способом. В одном воплощении ADCs к 158P1D7 и химиотерапевтическое средство вводят в виде отдельных молекул. Конкретные примеры химиотерапевтических средств или химиотерапии включает цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, мехлорэтамин (азотный иприт), стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубицин (адриамицин), даунорубицин, прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксель (таксол), доцетаксель (таксотер), алдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, дакарбазин, флоксуридин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, альфа-интерферон, лейпролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликатицин, митотан, пегаспаргаз, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, теинопозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепа, урациловый иприт, винорелбин, гемцитабин, хлорамбуцил, таксол и их комбинации.

Источник излучения при использовании его в сочетании с ADC к 158P1D7 может быть внешним или внутренним по отношению к подлежащему лечению пациенту. Когда источник является внешним для пациента, то лечение известно как дистанционная лучевая терапия (EBRT). Если источник радиации является внутренним для пациента, то лечение называют брахитерапией (BT).

Вышеописанные схемы лечения также могут комбинироваться с дополнительными средствами и/или схемами лечения рака, например с дополнительной химиотерапией, противораковыми вакцинами, ингибиторами передачи сигналов, средствами при лечении аномального клеточного роста или рака, антителами (например, с антителами против CTLA-4, описанными в WO/2005/092380 (Pfizer)), или с другими лигандами, ингибирующими рост опухолей путем связывания с IGF-1R, и цитокинами.

Когда млекопитающие подвергаются дополнительной химиотерапии, то можно использовать химиотерапевтические средства, описанные выше. Кроме того, можно использовать ингибиторы факторов роста, модификаторы биологических ответов, антигормональную терапию, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERMs), ингибиторы ангиогенеза и антиандрогены. Например, можно использовать антигормоны, к примеру, такие антиэстрогены, как Nolvadex (тамоксифен), либо такие антиандрогены, как Casodex (4'-циано-3-(4-фторфенилсульфонил)-2-гидрокси-2-метил-3'-(трифторметил)пропионанилид).

Вышеприведенные терапевтические подходы можно комбинировать с любыми из целого ряда хирургических, химиотерапевтических схем или режимов лучевой терапии. Терапевтические подходы по изобретению могут способствовать снижению дозировки при химиотерапии (или другой терапии) и/или менее частому введению, что является преимуществом для всех пациентов и в особенности для тех, кто плохо переносит токсичность химиотерапевтических средств.

XVI. Наборы/промышленные изделия.

В объем изобретения входят наборы для применения в описанных здесь лабораторных, прогностических, профилактических, диагностических и терапевтических применениях. Такие наборы могут включать носитель, упаковку или контейнер, которые разделены так, чтобы в них содержалась одна или несколько емкостей типа флаконов, пробирок и т.п., а каждая емкость содержит один из отдельных элементов, используемых в способе, вместе с этикеткой или вкладышем, содержащим инструкции по применению типа описанного здесь применения. Например, емкость может содержать антитело, в которое

введена или может быть введена детектируемая метка. Наборы могут включать емкость, содержащую звено лекарственного средства. Набор может включать все или часть аминокислотных последовательностей из фиг. 2 или 3 либо их аналоги или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такие аминокислотные последовательности.

Как правило, набор по изобретению включает описанный выше контейнер и один или несколько связанных с ним других контейнеров (емкостей), содержащих материалы, нужные с коммерческой и потребительской точки зрения, в том числе буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы; носитель, упаковку, тару, флаконы и/или пробирки с этикетками, на которых приведено их содержимое и/или инструкции по применению, и упаковочные вкладыши с инструкциями по применению.

Этикетка может находиться на контейнере или вместе с ним и указывает, что композиция применяется для специфической терапии или не для терапевтического применения, как-то прогностического, профилактического, диагностического или лабораторного применения, а также может содержать инструкции по применению *in vivo* либо *in vitro* типа тех, что описаны здесь. Инструкции и/или другая информация также может быть включена во вкладыши или этикетки, которые входят в состав или находятся на самом наборе. Этикетка может находиться на контейнере или быть связанной с ним. Этикетка находится на контейнере, если буквы, цифры или другие символы, составляющие этикетку, отлиты или выгравированы на самом контейнере; этикетка связана с контейнером, если она находится в сосуде или носителе, в котором также помещается контейнер, например в виде упаковочного вкладыша. Этикетка может указывать, что композиция применяется для диагностики, лечения, профилактики или прогнозирования заболевания типа рака тканей, приведенных в таблице I.

Термины "набор" и "промышленное изделие" могут применяться в качестве синонимов.

В другом воплощении изобретения предусмотрены промышленные изделия, содержащие композиции, как-то антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADCs), например материалы, применимые для диагностики, прогнозирования, профилактики и/или лечения рака тканей типа приведенных в табл. I. Как правило, промышленное изделие включает по меньшей мере один контейнер и по меньшей мере одну этикетку. Подходящие контейнеры включают, к примеру, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут состоять из различных материалов, таких как стекло, металл или пластик. Контейнер может содержать аминокислотные последовательности, небольшие молекулы, последовательности нуклеиновых кислот, популяции клеток и/или антитела. В другом воплощении контейнер содержит антитело, его связывающий фрагмент или специфический связывающий белок для применения при оценке экспрессии белка 158P1D7 в клетках и тканях или же для соответствующих лабораторных, прогностических, диагностических, профилактических и терапевтических целей; на контейнере или вместе с ним могут находиться указания и/или инструкции для таких применений, а также реагенты и другие композиции или средства, используемые для этих целей.

С другой стороны, контейнер может содержать композицию, которая эффективна для лечения, диагностики, прогнозирования или профилактики заболевания и может иметь стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробой, которая прокалывается иглой для подкожной инъекции). Активными веществами в композиции могут быть антитела, способными специфически связываться с 158P1D7, или конъюгаты антитело-лекарственное средство, специфически связывающиеся с 158P1D7.

Промышленное изделие также может включать и второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, как-то солевой раствор с фосфатным буфером, раствор Рингера и/или раствор декстрозы. Оно также может включать и другие материалы, нужные с коммерческой и потребительской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, мешалки, иглы, шприцы и/или упаковочные вкладыши с указаниями и/или инструкциями по применению.

Примеры

Различные аспекты изобретения более подробно описаны и проиллюстрированы на нескольких следующих примерах, ни один из которых не должен ограничивать объем изобретения.

Пример 1. Антиген 158P1D7.

Последовательность гена 158P1D7 была открыта методами супрессионной вычитательной гибридизации (SSH), известными в данной области. SSH-последовательность 158P1D7 в 223 п.о. была идентифицирована вычитанием из ракового пула мочевого пузыря минус нормальная кДНК мочевого пузыря. Полноразмерный клон кДНК для 158P1D7 был выделен из пула раковых тканей мочевого пузыря. Длина кДНК составляет 2555 п.о. и она кодирует ORF из 841 аминокислоты (см. фиг. 1). Ген 158P1D7 проявляет гомологию с геном SLITRK6. Дальнейшие ссылки см. в US 6,863,892 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA), US 7,358,353 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA) и EP 1,311,675 (Agensys, Inc., Santa Monica, CA). Типичные варианты антигена 158P1D7 приведены на фиг. 1.

Пример 2. Получение моноклональных антител (mAbs) к 158P1D7.

В одном воплощении терапевтические моноклональные антитела ("mAbs") к 158P1D7 и вариантам 158P1D7 включают антитела, которые реагируют с эпитопами, специфичными для каждого белка или специфичными к последовательностям, общим между вариантами, которые должны связываться, интернализироваться, нарушать или модулировать биологическую функцию 158P1D7 или вариантов 158P1D7,

например антитела, которые должны нарушать взаимодействие с лигандами, субстратами и партнерами по связыванию. Иммуногены для получения таких mAbs включают те, что составлены так, чтобы они кодировали или содержали внеклеточные домены или всю последовательность белка 158P1D7, участки, предположительно содержащие функциональные мотивы, и участки вариантов белка 158P1D7, предположительно антигенные по данным компьютерного анализа аминокислотной последовательности. Иммуногены включают пептиды и рекомбинантные белки типа tag5-158P1D7, полученного из клеток млекопитающих очищенного белка с His-тегом. Кроме того, для иммунизации мышей применяются клетки, сконструированные для высокого уровня экспрессии 158P1D7, такие как UMUC-158P1D7 или 3T3-158P1D7.

MAbs к 158P1D7 получали по технологии XenoMouse® (Amgen Fremont), при этом мышинные локусы тяжелой и легкой каппа-цепи были инактивированы и была вставлена большая часть локусов тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека. MAbs, обозначенное Ha15-10ac12, получали при иммунизации ксеномышей, вырабатывающих $\gamma 2$ человека, рекомбинантными клетками 3T3, экспрессирующими 158P1D7.

MAbs Ha15-10ac12 к 158P1D7 специфически связывается с экспрессирующими 158P1D7 клетками (рекомбинантными и эндогенными), а также с рекомбинантным белком 158P1D7 методом ELISA.

Кодирующие последовательности ДНК для mAb Ha15-10ac12 к 158P1D7 определяли после выделения мРНК из соответствующих клеток гибридомы с помощью реагента Trizol (Life Technologies, Gibco BRL).

Вариабельные последовательности нуклеиновых кислот тяжелой и легкой цепи антитела Ha15-10ac12 против 158P1D7 из клеток гибридомы секвенировали по следующей методике. Секретирующие Ha15-10ac12 клетки гибридомы лизировали с помощью реагента Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). Выделяли и количественно определяли тотальную РНК. Из тотальной РНК получали первую нить кДНК с помощью праймеров олиго(dT)12-18, используя систему Gibco-BRL Superscript Preamplification. Одноцепочечную кДНК амплифицировали с помощью праймеров для вариабельной области тяжелой цепи и праймеров для вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина человека. Продукты ПЦР секвенировали и определяли вариабельные области тяжелой и легкой цепи.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи представлены на фиг. 2 и 3. Выравнивание mAb Ha15-10ac12 с гаметным Ig человека представлено на фиг. 4A-4B.

Пример 3. Экспрессия Ha15-10ac12 методами рекомбинантной ДНК.

Для рекомбинантной экспрессии mAb Ha15-10ac12 в трансфицированных клетках клонировали последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи mAb Ha15-10ac12 впереди от константных областей тяжелой цепи IgG2 человека и легкой цепи Igk человека, соответственно. Полные кассеты тяжелой цепи и легкой цепи mAb Ha15-10ac12 человека клонировали позади от промотора/энхансера CMV в клонирующем векторе. Позади от кодирующей последовательности mAb вставляли сайт полиаденилирования. Конструкции, экспрессирующие рекомбинантное mAb Ha15-10ac12, трансфицировали в клетки CHO-K1SV. Родственные Ha15-10ac12 mAb, секретируемые из рекомбинантных клеток CHO, подвергали оценке на связывание с 158P1D7 на клеточной поверхности методом проточной цитометрии. Контрольные клетки UMUC и клетки UMUC-158P1D7 окрашивали с помощью mAb Ha15-10ac12 из клеток гибридомы или из клеток CHO, трансфицированных векторными конструкциями тяжелой и легкой цепи Ha15-10ac12. Связывание детектировали методом проточной цитометрии.

Результаты показывают, что экспрессированное рекомбинантно mAb Ha15-10ac12 при экспрессии в клетках CHO связывается с 158P1D7 аналогично Ha15-10ac12, выделенному из гибридомы. MAbs Ha15-10ac12, секретируемое из рекомбинантных клеток, также оценивали на связывание с рекомбинантным белком 158P1D7 методом ELISA. Связывание Ha15-10ac12 с белком 158P1D7 было идентичным между материалом mAb, полученным из клеток CHO и из клеток гибридомы.

Клетки яичников китайского хомячка (CHO), вырабатывающие антитело под названием Ha15-10ac12, были отправлены 25 июля 2012 г. (через Federal Express) в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, и получили номер доступа PTA-13102.

Пример 4. Конъюгирование антитела mAb Ha15-10ac12 с лекарственным средством.

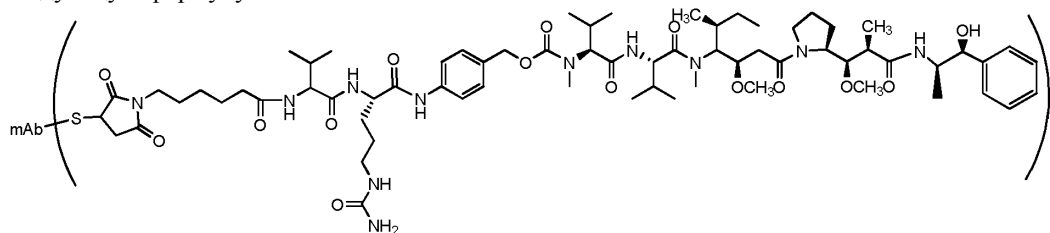
Mab Ha15-10ac12 (фиг. 2) конъюгировали с производным ауристатиона под названием MMAE (формула XI) с помощью описанного здесь линкера vc (Val-Cit), получая конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению, обозначенный Ha15-10ac12vcMMAE, по следующей методике. Конъюгирование линкера vc (Val-Cit) с MMAE (Seattle Genetics, Seattle, WA) осуществляли общим методом, приведенным в табл. IV, получая цитотоксический vcMMAE (см. US/2006/0074008).

Затем получали конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению, названный Ha15-10ac12vcMMAE, по следующей методике.

Вкратце, mAb Ha15-10ac12 в композиционном буфере (10 mM ацетата pH 5,0 с 5% сорбита) подвергали замене буфера на восстановительный буфер (25 mM бората натрия, 300 mM хлорида натрия, pH 9,0 $\pm$ 0,1). Затем mAb Ha15-10ac12 подвергали частичному восстановлению добавлением 5 mM ЭДТА и

2,65 молярных эквивалентов ТСЕР (по отношению к молям mAb Ha15-10ac12). Эту смесь затем перемешивали при 37°C в течение 3 (трех) ч. После восстановления дисульфидов смесь охлаждали до заданной температуры в 15-17°C и добавляли пять (5) эквивалентов лекарственного средства vcMMAE на 1 моль в виде 4% (об./об.) раствора в DMSO. Через 60-75 мин избыток непрореагировавшего линкера vc гасили добавлением N-ацетил-L-цистеина в количестве 1 моль на моль vcMMAE, добавленного в начале конъюгирования. Через 15 мин Ha15-10ac12vcMMAE доводили до заданного pH 6,0-6,4 с помощью концентрированного гистидинового буфера pH 5,2 и фильтровали через мембрану PES 0,5/0,2 мкм, чтобы удалить агрегированный конъюгат антитело-лекарственное средство. Сразу же после фильтрации проводили тангенциальное фильтрование для удаления DMSO и погашенного конъюгата линкер-лекарственное средство и для замены буфера у конъюгата антитело-лекарственное средство на 20 мМ гистидин (pH 6,0 ± 0,1), содержащий 5,5% безводной трегалозы. После тангенциального фильтрования Ha15-10ac12vcMMAE разбавляли до конечной концентрации 6 ± 1 мг/мл и добавляли полисорбат 20 до конечной концентрации 0,01%.

Полученный конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) обозначен Ha15-10ac12vcMMAE и имеет следующую формулу



где mAb означает Ha15-10ac12 (фиг. 2 и 3), а p составляет от 1 до 12. Предпочтительное значение p у конъюгата антитело-лекарственное средство, приведенного в данном примере, составляет от 3,5 до 3,7.

Пример 5. Характеристика Ha15-10ac12vcMMAE.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые связываются с 158P1D7, получали по методике, изложенной в примере под названием "Конъюгирование антитела mAb Ha15-10ac12 с лекарственным средством", подвергали скринингу, идентифицировали и характеризовали с использованием комбинации методов, известных в данной области.

А. Определение средства методом FACS.

Ha15-10ac12vcMMAE тестировали на средство связывания с 158P1D7, экспрессированным на поверхности клеток SW780. Вкратце, одиннадцать (11) разведений Ha15-10ac12vcMMAE инкубировали с клетками SW780 (50000 клеток на лунку) в течение ночи при 4°C в конечной концентрации от 6,67 до 0,0001 нМ. По окончании инкубации клетки отмывали и инкубировали с детектирующим антителом против hIgG-PE в течение 45 мин при 4°C. После отмывки несвязавшихся детектирующих антител клетки анализировали методом FACS. Получали значения средней интенсивности флуоресценции (MFI), приведенные в табл. VI. Значения MFI вводили в программу Graphpad Prism и анализировали по уравнению с одним сайтом связывания (гипербола) $Y = B_{\max} \times X / (K_d + X)$, получая кривую насыщения Ha15-10ac12vcMMAE, представленную на фиг. 13. $B_{\max}$ - значение MFI при максимальном связывании Ha15-10ac12vcMMAE с 158P1D7; K_d - средство связывания Ha15-10ac12vcMMAE, которое представляет собой концентрацию Ha15-10ac12vcMMAE, необходимую для достижения полумаксимального связывания.

Рассчитанное средство (K_d) связывания Ha15-10ac12vcMMAE с 158P1D7, экспрессированным на поверхности клеток SW780, составляет 0,005 нМ.

В. Связывание по данным FACS.

Ha15-10ac12vcMMAE тестировали методом FACS на связывание с 158P1D7, экспрессированным на поверхности клеток UMUC, SW780 и ТЭЦ-212. Вкратце, клетки собирали и высевали в концентрации 50 000 клеток на лунку. Ha15-10ac12vcMMAE разбавляли до 3 мкг/мл (для клеток UMUC и SW780) или 10 мкг/мл (для клеток СНР-212) и инкубировали с клетками (1 ч при 4°C). По окончании инкубации клетки отмывали и инкубировали с детектирующим антителом против hIgG-PE в течение 1 ч при 4°C. После отмывки несвязавшихся детектирующих антител клетки анализировали методом FACS. Представлены полученные значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) (табл. VII) и гистограммы (фиг. 14).

Пример 6. Опосредованная Ha15-10ac12vcMMAE клеточная цитотоксичность *in vitro*.

Способность Ha15-10ac12vcMMAE опосредовать зависимую от SLITRK-6 цитотоксичность оценивали на линии клеток СНР-212 нейробластомы человека, которая эндогенно экспрессирует SLITRK-6, и линии клеток рака яичников человека, IGROV-1, которая не экспрессирует SLITRK-6.

Вкратце, клетки СНР-212 и IGROV-1 высевали в 50 мкл полной среды при плотности 1000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты и помещали в инкубатор для культуры тканей при 37°C, 5% CO₂. На следующий день готовили исходный раствор 2× Ha15-10ac12vcMMAE и антитела контрольного изотипа, конъюгированного с vcMMAE, в полной среде, и 50 мкл серийных разведений ADCs вносили в соответствующие лунки. Клетки обрабатывали Ha15-10ac12vcMMAE и антителом контрольного изотипа, конъю-

югированным с vcMMAE, в течение шести (6) дней в инкубаторе для тканевых культур при 37°C, 5% CO₂. По окончании периода инкубации в каждую лунку добавляли 12 мкл Alamar Blue или Presto Blue и инкубировали в течение четырех (4) ч. Планшеты считывали на считывающем устройстве BioTek Syngu H4, при длине волны возбуждения 540 нм и испускания 590 нм.

Эти данные показывают, что ADC под названием Ha15-10ac12vcMMAE может избирательно индуцировать цитотоксичность у экспрессирующей SLITRK-6 линии клеток CHP-212, но не способен индуцировать цитотоксичность у линии клеток IGROV-1, не экспрессирующей SLITRK-6. Таким образом, эти результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE может избирательно доставлять цитотоксическое лекарственное средство к клеткам, экспрессирующим 158P1D7, что приводит к их гибели (фиг. 15).

В другом эксперименте клетки нейробластомы человека, CHP-212, которые экспрессируют SLITRK6 (мишень для mAb Ha15-10ac12 и mAb M15-68(2)18) (иначе 68(18)1.1, см. WO 2004/072263)), инкубировали с исследуемыми изделиями, Ha15-10ac12vcMMAE и M15-68(2)18, чтобы продемонстрировать у них активность *in vitro*, вызывающую гибель клеток (цитотоксичность). Вкратце, в 96-луночные планшеты высевали по 4000 клеток CHP-212/мл и добавляли исследуемые антитела в серийных разведениях от 10 000 нг/мл до 0,006 нг/мл, используя 6-кратные разведения по 9 точкам плюс 0,0 нг/мл в последней лунке. Лунки ставили в трех повторах. Кроме того, таким же образом ставили контрольные антитела и контрольные клетки (IGROV-1) для сравнения с исследуемыми изделиями. Проводили инкубацию в течение 4 дней, после чего в лунки добавляли Presto Blue (пигмент, который окрашивает живые клетки), чтобы получить колориметрический показатель жизнеспособности клеток. Затем рассчитывали степень выживаемости клеток в каждой лунке и анализировали данные с использованием нелинейной аппроксимации сигмоидной зависимости доза-эффект. Рассчитывали значения IC₅₀ с помощью программы Graphpad Prism и сравнивали цитотоксические эффекты Ha15-10ac12vcMMAE с M15-68(2)18 и другими контролями, использовавшимися в этом эксперименте.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE обладает большей цитотоксичностью *in vitro* по сравнению с антителом M15-68(2)18 и другими контролями (фиг. 11). Значение IC₅₀ для Ha15-10ac12vcMMAE составляло 0,9076, а IC₅₀ для M15-68(2)18 было невозможно рассчитать.

Пример 7. Ha15-10ac12vcMMAE ингибирует рост опухолей *in vivo*.

Значительная экспрессия 158P1D7 на клеточной поверхности опухолевых тканей, вместе с ограниченной экспрессией его в нормальных тканях делает 158P1D7 хорошей мишенью для терапии антителами, равно как терапии с помощью ADC. Поэтому оценивали терапевтическую эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на моделях ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря, легких, молочной железы и глиобластомы человека у мышей.

Исследовали действие конъюгата антитело-лекарственное средство на рост опухолей и образование метастазов на моделях ксенотрансплантатов рака у мышей (например, подкожных и ортотопических).

Подкожные (s.c.) опухоли получали путем инъекции 5×10^4 - 10^6 раковых клеток, смешанных в разведении 1:1 с Matrigel (Collaborative Research), в правый бок самцов мышей SCID. Для проверки действия ADC на формирование опухолей инъекции ADC начинали в тот же день, что и инъекции опухолевых клеток. В качестве контроля мышам вводили либо очищенные IgG человека, либо PBS, или же очищенное mAb, которое распознает посторонний антиген, не экспрессирующийся в клетках человека. В предварительных опытах не было обнаружено никакой разницы между действием контрольного IgG или PBS на рост опухолей. Размеры опухолей определяли с помощью кронциркуля, а объем опухолей рассчитывали как ширина² × длину/2, при этом ширина означает наименьший размер, а длина - наибольший. Мышей с подкожными опухолями размером более 1,5 см в диаметре умерщвляли.

Преимущество моделей раковых ксенотрансплантатов заключается в возможности исследовать неоваскуляризацию и ангиогенез. Рост опухолей частично зависит от возникновения новых кровеносных сосудов. Хотя капиллярная система и возникающая кровеносная сеть происходят из организма хозяина, однако инициирование и архитектура новой сосудистой системы регулируется ксенотрансплантатом опухоли (Davidoff et al., Clin. Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. (1984) 20:1295). Эффект антител и небольших молекул на неоваскуляризацию исследовали в соответствии с известными методами, такими как анализ методом ИНС опухолевых тканей и окружающей их микросреды.

ADCs к 158P1D7.

Моноклональные антитела против 158P1D7 получали, как описано в примере под названием "Получение моноклональных антител (mAbs) к 158P1D7". В дальнейшем mAbs конъюгировали с токсином, как описано в примере под названием "Конъюгирование антитела mAb Ha15-10ac12 с лекарственным средством", получая Ha15-10ac12vcMMAE. Ha15-10ac12vcMMAE характеризовали методом FACS и другими известными методами, чтобы определить его способность к связыванию 158P1D7.

Клеточные линии и ксенотрансплантаты.

Клетки содержали в среде DMEM с добавлением L-глутамина и 10% FBS, как это известно в данной области. Ксенотрансплантаты AG-B7, RT-4-XCL и NCI-H322M-XCL поддерживали путем серийного размножения в мышах SCID. Клетки SW780 и RT-4-XCL происходят из линии раковых клеток мочевого

пузыря, полученных из ATCC (Manassas, VA). Ксенотрансплантаты AG-B7 и AG-B8 происходят из образцов рака мочевого пузыря человека, полученных от пациентов. Специалистам должно быть понятно, что на ADCs по изобретению проводилось множество экспериментов *in vivo*. Это частично обусловлено тем, что каждая модель *in vivo*, даже если она относится к одному и тому же заболеванию, проявляет определенную степень непредсказуемости для специалистов. Поэтому специалистам должно быть понятно, что использование нескольких типов моделей *in vivo* позволит специалистам в данной области лучше оценить ADCs по изобретению.

Оценка Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов AG-B7 рака мочевого пузыря человека у мышей SCID.

В этом эксперименте раковые клетки AG-B7 мочевого пузыря человека (5×10^6 клеток на мышь) инъецировали в бок отдельным мышам SCID и давали расти опухолям без обработки, пока они не достигли объема примерно 250 мм^3 . В этот момент животных разбивали на группы в зависимости от объема опухолей на момент начала лечения, чтобы обеспечить одинаковый средний размер опухолей и изменчивость в каждой группе, с помощью программы Study Director (v. 1.7; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Все обработанные ADC группы получали однократную дозу в 10 мг/кг посредством внутривенной болюсной инъекции. Рост опухолей в каждой группе отслеживали по два раза в неделю по измерениям с помощью кронциркуля вплоть до окончания исследования. Статистический анализ объема опухолей проводили в последней точке времени, когда были собраны данные со всех групп, методом непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) по ранжированным данным.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE проявляет сильный ингибирующий эффект по сравнению с необработанным контролем ($p < 0,0001$) (фиг. 5). RT-4-XCL.

Оценка Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов RT-4-XCL рака мочевого пузыря человека у мышей SCID.

В другом эксперименте отбирали исходные опухоли из ксенотрансплантатов AG-B7 рака мочевого пузыря человека в стерильных условиях и измельчали на мелкие кусочки (примерно 1 мм^3). По 6 кусочков имплантировали подкожно в бок отдельным мышам SCID. Когда средний объем опухолей достигал заданного размера в 100 мм^3 , животных случайным образом разбивали на обработанные ADC группы и необработанную контрольную группу (см. график объема опухолей) с близким средним размером опухолей и изменчивостью в каждой группе, с помощью программы Study Director (v. 1.7; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Все обработанные ADC группы, включая два контрольных ADCs, получали однократную дозу в 5 мг/кг посредством внутривенной болюсной инъекции. Рост опухолей в каждой группе отслеживали по два раза в неделю по измерениям с помощью кронциркуля вплоть до окончания исследования. Статистический анализ объема опухолей проводили в последней точке времени, когда были собраны данные со всех групп, методом непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) по ранжированным данным.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE проявлял сильный эффект ингибирования опухолей по сравнению с необработанным контролем или с соответствующим контрольным ADC - H3-1.4.1.2vcMMAE (у обоих $p < 0,0001$) (фиг. 6).

Оценка Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов NCI-H322M-XCL рака легких человека у мышей SCID

В другом эксперименте раковые клетки NCI-H322M-XCL легких человека ($2,5 \times 10^6$ клеток на мышь) инъецировали в бок отдельным мышам SCID и давали расти опухолям без обработки, пока они не достигли объема примерно 200 мм^3 . В этот момент животных разбивали на группы в зависимости от объема опухолей на момент начала лечения, чтобы обеспечить одинаковый средний размер опухолей и изменчивость в каждой группе, с помощью программы Study Director (v. 1.7; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Все получавшие ADC группы, включая два контрольных ADCs, получали дозы по 3 мг/кг два раза в неделю, в общей сложности 5 доз, посредством внутривенной болюсной инъекции. Рост опухолей в каждой группе отслеживали по два раза в неделю по измерениям с помощью кронциркуля вплоть до окончания исследования. Статистический анализ объема опухолей проводили в последней точке времени, когда были собраны данные со всех групп, методом непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) по ранжированным данным.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE проявлял сильный ингибирующий эффект по сравнению с контролем на носитель ($p < 0,0001$) или с соответствующим контрольным ADC - Ha3-12bc1.1vcMMAE ($p = 0,0041$) (фиг. 7).

Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов AG-B7 рака мочевого пузыря человека у мышей SCID

В другом эксперименте отбирали исходные опухоли из ксенотрансплантатов AG-B7 рака мочевого пузыря человека в стерильных условиях и измельчали их на мелкие кусочки (примерно 1 мм^3). По 5 кусочков имплантировали подкожно в бок отдельным мышам SCID. Опухолям давали расти без обработки, пока они не достигали объема примерно 200 мм^3 . В этот момент животных разбивали на группы в зависимости от объема опухолей на момент начала лечения, чтобы обеспечить одинаковый средний размер

опухолей и изменчивость в каждой группе, с помощью программы Study Director (v.1.7; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Все получавшие ADC группы, включая два контрольных ADCs, получали дозы по 0,5 мг/кг два раза в неделю, в общей сложности 7 доз, посредством внутривенной болюсной инъекции. Рост опухолей в каждой группе отслеживали по два раза в неделю по измерениям с помощью кронциркуля вплоть до окончания исследования. Статистический анализ объема опухолей проводили в последней точке времени, когда были собраны данные со всех групп, методом непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) по ранжированным данным.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE, полученные как из гибридомы (Ha15-10ac12.1vcMMAE), так и из клеток CHO (Ha15-10ac12vcMMAE), проявляли сильный эффект ингибирования опухолей по сравнению с контролем на носитель ($p < 0,0001$) или с соответствующим контрольным ADC - Ha3-12abc1vcMMAE ($p < 0,0001$) (фиг. 8).

Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов SW780 рака мочевого пузыря человека у мышей SCID.

В другом эксперименте клетки SW780 ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека имплантировали в бок мышам SCID и давали расти опухолям, пока они не достигали объема примерно 200 мм³. В этот момент животных разбивали на опытные группы в зависимости от объема опухолей на момент начала лечения, чтобы обеспечить одинаковый средний размер опухолей и изменчивость в каждой группе. Разбивка мышам на опытные группы проводилась с помощью программы Study Director (v.1.7; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA) так, чтобы размер опухолей соответствовал мышам. Все получавшие ADC группы, включая два контрольных ADCs, получали дозы в 1 мг/кг посредством внутривенной болюсной инъекции в начале исследования. Рост опухолей в каждой группе отслеживали по два раза в неделю по измерениям с помощью кронциркуля вплоть до окончания исследования. Статистический анализ объема опухолей проводили в последней точке времени, когда были собраны данные со всех групп, методом непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) по ранжированным данным.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE обладает большей активностью ингибирования опухолей по сравнению с mAb Ha15-10ac12. Кроме того, можно сделать вывод, что mAb Ha15-10ac12 не обладает ингибирующим действием на опухоли, так как динамика роста опухолей в этой опытной группе следует таковой у антител изотипного контроля. Кроме того, после однократной дозы в 1 мг/кг, Ha15-10ac12vcMMAE проявлял статистически значимое ингибирование роста по сравнению с ADC изотипного контроля ($p < 0,001$) (фиг. 10).

Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно полученных от пациента ксенотрансплантатов AG-B8 рака мочевого пузыря человека у мышей SCID.

В другом эксперименте полученные от пациента кусочки опухолей AG-B8 рака мочевого пузыря человека имплантировали в бок мышам SCID и давали расти опухолям, пока они не достигали объема примерно 200 мм³. В этот момент животных разбивали на опытные группы в зависимости от объема опухолей на момент начала лечения, чтобы обеспечить одинаковый средний размер опухолей и изменчивость в каждой группе. Разбивка мышам на опытные группы проводилась с помощью программы Study Director (v.1.7; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA) так, чтобы размер опухолей соответствовал мышам. Все получавшие ADC группы, включая два контрольных ADCs, получали дозы в 5 мг/кг посредством внутривенной болюсной инъекции в начале исследования (день 0). Рост опухолей в каждой группе отслеживали по два раза в неделю по измерениям с помощью кронциркуля вплоть до окончания исследования. Статистический анализ объема опухолей проводили в последней точке времени, когда были собраны данные со всех групп, методом непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) по ранжированным данным.

Результаты показывают, что Ha15-10ac12vcMMAE обладает большей активностью ингибирования опухолей, чем необработанный контроль ($p < 0,0001$) или другие контроли, соответствующие ADC гамма-2 ($p < 0,0001$). Кроме того, Ha15ac12vcMMAE проявлял и более высокий статистически значимый эффект по сравнению с Ha15-10ac12mcMMAF ($p < 0,0458$) (фиг. 12).

Заключение.

Итак, из фиг. 5-8, 10 и 12 видно, что ADC к 158P1D7 под названием Ha15-10ac12vcMMAE существенно ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих 158P1D7, по сравнению с контрольными ADC. Таким образом, Ha15-10ac12vcMMAE может применяться в терапевтических целях для лечения и контролирования раковых заболеваний, приведенных в табл. I. В частности, эти результаты означают, что Ha15-10ac12vcMMAE обладает ингибирующим действием на различные типы моделей рака мочевого пузыря, свидетельствуя, что он может быть особенно терапевтически полезным при лечении рака мочевого пузыря.

Пример 8. Клинические испытания на людях для лечения и диагностики карциномы человека при помощи ADCs к 158P1D7.

В соответствии с настоящим изобретением, ADCs к 158P1D7, которые специфически связываются с 158P1D7, могут применяться при лечении некоторых опухолей, предпочтительно тех, что перечислены в табл. I. В связи с каждым из этих показаний, успешно применяются два клинических подхода.

I. Вспомогательная терапия. При вспомогательной терапии пациентов лечат ADCs к 158P1D7 в со-

четании с химиотерапевтическим или противоопухолевым средством и/или лучевой терапией либо их комбинацией. Первичные раковые мишени типа тех, что приведены в табл. I, лечат по стандартной методике путем добавления ADCs к 158P1D7 к стандартной терапии первого и второго ряда. Методики составляют с упором на эффективность, о чем свидетельствуют следующие примеры, в том числе, но без ограничения, на снижение массы у первичных или метастатических опухолей, повышение выживаемости без прогрессирования, выживаемость в целом, улучшение здоровья у пациентов, стабилизацию заболевания, а также на возможность снижения обычных доз стандартных средств химиотерапии и других биологических средств. Такие снижения дозировки позволяют проводить дополнительную и/или длительную терапию за счет снижения связанной с дозой токсичности химиотерапевтического или биологического средства. ADCs к 158P1D7 использовались в нескольких вспомогательных клинических испытаниях в сочетании с химиотерапевтическими или противоопухолевыми средствами.

II. Монотерапия. В связи с применением ADCs к 158P1D7 при монотерапии опухолей они вводятся пациентам без химиотерапевтических или противоопухолевых средств. В одном воплощении монотерапия проводится в клинике у больных раком в конечной стадии с обширным метастатическим заболеванием. Методики составляют с упором на эффективность, о чем свидетельствуют следующие примеры, в том числе, но без ограничения, на снижение массы у первичных или метастатических опухолей, повышение выживаемости без прогрессирования, выживаемость в целом, улучшение здоровья у пациентов, стабилизацию заболевания, а также на возможность снижения обычных доз стандартных средств химиотерапии и других биологических средств.

Дозировка.

Схемы дозировки можно корректировать так, чтобы обеспечить оптимальную нужную реакцию. Например, можно вводить одним болюсом, несколькими дробными дозами на протяжении какого-то времени или же можно уменьшить или увеличить дозу соразмерно тому, как потребует терапевтическая ситуация. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в стандартной дозовой форме для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная дозовая форма в настоящем изобретении означает физически дискретные единицы, пригодные в качестве единицы дозы для подлежащих лечению субъектов-млекопитающих; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное на оказание нужного терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификации на стандартные дозовые формы по изобретению диктуются и непосредственно зависят от (а) уникальных характеристик антитела и/или ADC и достигаемого конкретного терапевтического или профилактического эффекта, и (b) существующих ограничений в области составления таких активных соединений для лечения чувствительности у индивидов.

Типичный, без ограничения, диапазон терапевтически эффективного количества ADC к 158P1D7 при введении в комбинации по изобретению составляет от 0,5 до 10 мг/кг, 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 типичные, без ограничения, диапазоны: к примеру, от 0,5 до 5 мг/кг или же от 0,8 до 5 мг/кг или же от 1 до 7,5 мг/кг. Воплощения изобретения с высокой дозой касаются дозировки более 10 мг/кг. Следует отметить, что величина дозировки может варьироваться в зависимости от типа и тяжести подлежащего лечению заболевания и может включать однократные или многократные дозы. Также следует иметь в виду, что для любого конкретного субъекта определенные схемы дозировки нужно корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением лица, назначающего или надзирающего за введением композиций, а приведенные здесь диапазоны доз являются только лишь примерными и не предназначены для ограничения объема или практического применения заявленной композиции.

План клинической разработки (CDP).

CDP следует за и разрабатывает способы лечения с помощью ADCs к 158P1D7 в связи со вспомогательной терапией или монотерапией. Испытания сначала демонстрируют безопасность, а после этого подтверждают эффективность при повторных дозах. Испытания являются открытыми и в них проводится сравнение стандартной химиотерапии со стандартной терапией плюс ADCs к 158P1D7. Как должно быть известно, одним из неограничительных критериев, который может применяться в связи с зачислением пациентов, является уровень экспрессии 158P1D7 в опухолях, что определяется при биопсии.

Как и с любым способом терапии на основе инфузии белка или антител, проблемы безопасности главным образом связаны с (i) синдромом высвобождения цитокинов, т.е. гипотонией, лихорадкой, дрожью, ознобом; (ii) возникновением иммунной реакции на материал (т.е. появлением у пациента человеческих антител к терапевтическому антителу, или ответом НАМА); и (iii) токсичностью для нормальных клеток, экспрессирующих 158P1D7. Для мониторинга каждой из этих проблем безопасности используются стандартные тесты и последующее наблюдение. ADCs к 158P1D7 оказались безопасными при введении людям.

Пример 9. Выявление белка 158P1D7 методом ИНС в образцах больных раком.

Экспрессию белка 158P1D7 проверяли методом иммуногистохимии в образцах опухолей пациентов из (i) мочевого пузыря, (ii) молочной железы, (iii) легких и (iv) глиобластомы больных раком. Вкратце, фиксированные формалином и заключенные в твердый парафин ткани нарезали на срезы толщиной в 4

мкм и устанавливали на предметные стекла. Срезы депарафинизировали, регидратировали и обрабатывали антиген-восстанавливающим раствором Citra (Biogenex, San Ramon, CA) в микроволновке EZ-Retriever (Biogenex, San Ramon, CA) в течение 15 мин при 95°C. Затем срезы обрабатывали 3% раствором перекиси водорода для инактивации эндогенной пероксидазной активности. Для ингибирования неспецифического связывания перед инкубацией с моноклональным мышинным антителом против 158P1D7 или изотопным контролем использовали бессывороточный блокирующий белок (Dako, Carpinteria, CA). После этого срезы обрабатывали с помощью детектирующей системы Super Sensitive™ Polymer-пероксидаза хрена (HRP), которая состоит из инкубации в реагенте Super Enhancer™ и последующей инкубации с конъюгатом полимер-HRP-вторичное антитело (BioGenex, San Ramon, CA). Затем срезы проявляли с помощью набора DAB (BioGenex, San Ramon, CA). Ядра окрашивали гематоксилином и анализировали методом микроскопии в ярком поле. Специфическое окрашивание в образцах пациентов детектировали с помощью иммунореактивного антитела к 158P1D7, по коричневой окраске (см. фиг. 9A, 9C, 9E и 9G). В противоположность этому, контрольное антитело не окрашивало ни один образец пациентов (см. фиг. 9B, 9D, 9F и 9H).

Результаты свидетельствуют об экспрессии 158P1D7 в опухолевых клетках больных раком мочевого пузыря, молочной железы, легких и глиобластомы. Эти результаты означают, что 158P1D7 экспрессируется в раковых тканях человека, а антитела против этого антигена и конъюгат антитело-лекарственное средство под названием Ha15-10ac12vcMMAE применимы для диагностических и терапевтических целей (фиг. 9).

По всей заявке приводятся ссылки на данные веб-сайтов с различным контентом, публикации, патентные заявки и патенты (веб-сайты обозначаются по адресам Uniform Resource Locator, т.е. URL, на World Wide Web). Содержание каждой из этих ссылок включено сюда путем ссылки во всей полноте.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться в объеме раскрытыми здесь воплощениями, которые служат лишь в качестве иллюстрации отдельных аспектов изобретения, а их функциональные эквиваленты входят в объем изобретения. Различные модификации моделей и способов изобретения, в дополнение к тем, что описаны здесь, должны быть очевидны специалистам в данной области из предшествующего описания и его положений и тоже должны входить в объем изобретения. Такие модификации или другие воплощения могут применяться на практике без отхода от истинного объема и сути изобретения.

Таблицы.

Таблица I. Ткани,
экспрессирующие
158P1D7 при
раковых
заболеваниях
Глиобластома
Легкие
Мочевой пузырь
Молочная железа

Таблица II. Сокращенные обозначения аминокислот

Однобуквенное	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 VI. Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) по данным FACS

нМ	Ha15-10ac12vcMMAE
6,667	155,0
2,222	149,6
0,741	140,9
0,247	133,8
0,082	124,0
0,027	107,6
0,0091	87,0
0,0030	60,8
0,0010	25,7
0,0003	14,9
0,0001	4,3

Таблица VII. Значения MFI для связывания Ha15-10ac12vcMMAE по данным FACS

	UMUC-AGS15	SW780	CHP-212
MFI	115	159	142

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конъюгированы с монометилауристатином Е (ММАЕ), при этом антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, при этом антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конъюгированы с монометилауристатином Е (ММАЕ), причем антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа PTA-13102, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности переменной области легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.3, при этом антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка

(CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-4, при этом антитело или его фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, где CDR определяются согласно системе нумерации Kabat, Chotia или системе нумерации Contact, предпочтительно где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 31 до 35 SEQ ID NO: 7, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 50 до 66 SEQ ID NO: 7, и CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 99 до 109 SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 24 до 39 SEQ ID NO: 8, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 55 до 61 SEQ ID NO: 8, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 94 до 102 SEQ ID NO: 8.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-5, при этом антитело дополнительно включает константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи IgG человека.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-6 при этом антитело является:

- (i) полностью человеческим антителом; или
- (ii) антителом, полученным рекомбинантным способом.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-7, при этом фрагмент представляет собой фрагмент Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-8, где антитело или его фрагмент конъюгировано с MMAE через линкерное звено.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где линкерное звено является расщепляемым ферментом пептидным линкером, предпочтительно где линкерное звено образует связь с атомом серы в антителе или его фрагменте.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-10, при этом конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую формулу



где L представляет собой анти-158P1D7 антитело или его фрагмент, раскрытые в любом из пп.1-10;

(LU-D) означает звено линкера-звено лекарственного средства,

где LU- означает звено линкера,

-D означает MMAE; a

p - целое число от 1 до 20, предпочтительно где p находится в диапазоне от 1 до 10, или где p находится в диапазоне от 1 до 5.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.9-11, при этом линкерное звено имеет следующую формулу



где -A- означает звено удлинителя,

a равно 0 или 1,

W- означает аминокислотное звено,

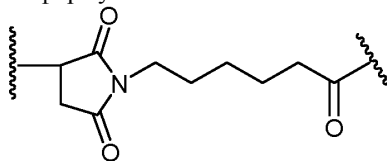
w - целое число от 0 до 12,

-Y- означает звено самоликвидирующегося спейсера,

y равно 0, 1 или 2;

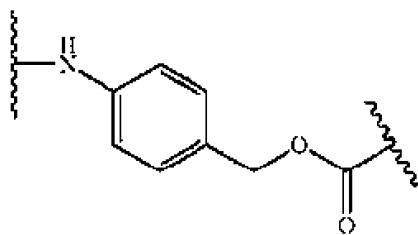
предпочтительно где аминокислотное звено содержит валин-цитруллин (Val-Cit).

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.11 или 12, при этом звено удлинителя представлено структурой формулы IIIa



формула IIIa

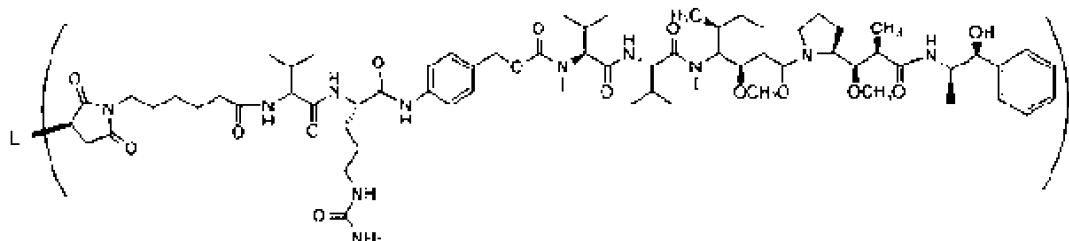
a аминокислотное звено является валином-цитруллином (Val-Cit), и звено спейсера представлено структурой формулы Xa



формула Xa,

предпочтительно где звено удлинителя образует связь с атомом серы антитела или его фрагмента, где звено спейсера является звеном р-аминобензилового спирта (РАВ), и где звено спейсера связано с ММАЕ через карбаматную группу.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-13, при этом конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



где r находится в диапазоне от 1 до 10, предпочтительно где r находится в диапазон от 2 до 5.

15. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-14 в дозированной для человека лекарственной форме, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит химиотерапевтическое средство в стандартной дозовой форме для человека.

16. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-14 в способе лечения рака у субъекта, где рак представляет собой глиобластому, рак легких, рак мочевого пузыря или рак молочной железы.

17. Применение по п.16, где субъект представляет собой человека.

18. Применение по п.16 или 17, где способ предусматривает введение субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство в количестве 1, 2, 3, 4, 5 или 6 мг/кг массы тела.

19. Применение по п.16, где способ дополнительно включает воздействие на субъекта излучением или химиотерапевтическим агентом.

20. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2, и CDR-H3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, где CDR определяются согласно системе нумерации Kabat, Chotia или системе нумерации Contact.

21. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 31 до 35 SEQ ID NO: 7, CDR-H2, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 50 до 66 SEQ ID NO: 7, и CDR-H3, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 99 до 109 SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 24 до 39 SEQ ID NO: 8, CDR-L2, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 55 до 61 SEQ ID NO: 8, и CDR-L3, состоящий из аминокислотной последовательности в пределах от 94 до 102 SEQ ID NO: 8.

22. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

23. Анти-158P1D7 антитело или его фрагмент по п.22, при этом антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

24. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.20-23, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в пределах от положения 1 до положения 120 в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в пределах от положения 1 до положения 113 в SEQ ID NO: 8.

25. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.20-24, где антитело включает тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности в пределах от положения 1 до положения 446 в SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности в пределах от положения 1 до положения 219 в SEQ ID NO: 8.

26. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2, и CDR-H3 из переменной области тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа PTA-13102, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3 из переменной области легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102, где CDR определяются согласно системе нумерации Kabat, Chotia или системе нумерации Contact.

27. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа PTA-13102, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% гомологичную последовательности переменной области легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR, содержащие аминокислотные последовательности CDR из аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

28. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.27, при этом антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичную последовательности переменной области легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102.

29. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.26-28, при этом антитело или его фрагмент включают переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102.

30. Анти-158P1D7 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.26-29, при этом антитело включает тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, вырабатываемого клетками яичников китайского хомячка (CHO), депонированными в ATCC под номером доступа PTA-13102.

31. Анти-158P1D7 антитело или его фрагмент по любому из пп.20-24 или 26-29, дополнительно включающие константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи IgG человека.

32. Анти-158P1D7 антитело или его фрагмент по п.31, при этом константная область тяжелой цепи IgG соответствует IgG2, а константная область легкой цепи - каппа-цепи.

33. Анти-158P1D7 антитело или его фрагмент по пп.20-32, при этом фрагмент представляет собой фрагмент Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.20-33, при этом антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.20-34, при этом антитело получено рекомбинантным способом.

кДНК (SEQ ID NO: 1) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2) 158P1D7. Начальный метионин подчеркнут. Открытая рамка считывания простирается от нуклеотида 23 до 2548, включая стоп-кодон

```

1           M K L W I H L F Y S S L L
1  tcggatttcacatgacacacATGAAGCTGTGGATTTCATCTCTTTATTTCATCTCTCTCT
14  A C I S L H S Q T P V L S S R G S C D S
61  TGCCTGTATATCTTTACACTCCCAAACTCCAGTGCTCTCATCCAGAGGCTCTTGTGATTC
34  L C N C E E K D G T M L I N C E A K G I
121 TCTTTGCAATTGTGAGGAAAAAGATGGCACAATGCTAATAAATTGTGAAGCAAAAGGTAT
54  K M V S E I S V P P S R P F Q L S L L N
181 CAAGATGGTATCTGAAATAAGTGTGCCACCATCACGACCTTTCCAACTAAGCTTATTAAA
74  N G L T M L H T N D F S G L T N A I S I
241 TAACGGCTTGACGATGCTTCACACAAATGACTTTTCTGGGCTTACCAATGCTATTTCAT
94  H L G F N N I A D I E I G A F N G L G L
301 ACACCTTGGATTTAACAATATTGCAGATATTGAGATAGGTGCATTTAATGGCCTTGGCCT
114 L K Q L H I N H N S L E I L K E D T F H
361 CCTGAAACAACTTCATATCAATCACAATTCCTTTAGAAATCTTAAAGAGGATACTTTCCA
134 G L E N L E F L Q A D N N F I T V I E P
421 TGGACTGGAAAACCTGGAATTCTGCAAGCAGATAACAATTTATCAGTGTATTGAACC
154 S A F S K L N R L K V L I L N D N A I E
481 AAGTGCCTTTAGCAAGCTCAACAGACTCAAAGTGTTAATTTTAAATGACAATGCTATTGA
174 S L P P N I F R F V P L T H L D L R G N
541 GAGTCTTCCTCCAAACATCTTCCGATTTGTTCTTTAACCCTATAGATCTTCGTGGAAA
194 Q L Q T L P Y V G F L E H I G R I L D L
601 TCAATTACAACATTCGCTTATGTTGGTTTCTCGAACACATTGGCCGAATATTGGATCT
214 Q L E D N K W A C N C D L L Q L K T W L
661 TCAGTTGGAGGACAACAAATGGGCCTGCAATTGTGACTTATTGCAGTTAAAAACTTGGTT
234 E N M P P Q S I I G D V V C N S P P F F
721 GGAGAACATGCCTCCACAGTCTATAATTGGTGATGTTGTCTGCAACAGCCCTCCATTTT
254 K G S I L S R L K K E S I C P T P P V Y
781 TAAAGGAAGTATACTCAGTAGACTAAAGAAGGAATCTATTGCCCCTACTCCACCACTGTA
274 E E H E D P S G S L H L A A T S S I N D
841 TGAAGAACATGAGGATCCTTCAGGATCATTACATCTGGCAGCAACATCTTCAATAAATGA
294 S R M S T K T T S I L K L P T K A P G L
901 TAGTCGCATGTCAACTAAGACCACGTCCATTCTAAAACTACCCACCAAGCACCAGGTTT

```

Фиг. 1

314 I P Y I T K P S T Q L P G P Y C P I P C
 961 GATACCTTATATTACAAAGCCATCCACTCAACTCCAGGACCTTACTGCCCTATTCTTG
 334 N C K V L S P S G L L I H C Q E R N I E
 1021 TAACTGCAAAAGTCTATCCCCATCAGGACTTCTAATACATTGTGAGGAGCGCAACATTGA
 354 S L S D L R P P P Q N P R K L I L A G N
 1081 AAGCTTATCAGATCTGAGACCTCCTCCGCAAAATCCTAGAAAGCTCATTCTAGCGGAAAA
 374 I I H S L M K S D L V E Y F T L E M L H
 1141 TATTATTACAGTTTAAATGAAGTCTGATCTAGTGAATATTTCACTTTGAAAATGCTTCA
 394 L G N N R I E V L E E G S F M N L T R L
 1201 CTTGGGAAACAATCGTATTGAAGTCTTGAAGAAGGATCGTTTATGAACCTAACGAGATT
 414 Q K L Y L N G N H L T K L S K G M F L G
 1261 ACAAAAACCTCTATCTAAATGGTAACCACTGACCAAAATTAAGTAAAGGCATGTTCTTGG
 434 L H N L E Y L Y L E Y N A I K E I L P G
 1321 TCTCCATAATCTTGAATACTTATATCTTGAATACAATGCCATTAAGGAAATACTGCCAGG
 454 T F N P M P K L K V L Y L N N N L L O V
 1381 AACCTTTAATCCAATGCCTAAACTTAAAGTCTGTATTTAAATAACAACCTCCTCCAAGT
 474 L P P H I F S G V P L T K V N L K T N Q
 1441 TTTACCACCACATATTTTTTCAGGGGTTCTCTAACTAAGGTAATCTTAAACAACCA
 494 F T H L P V S N I L D D L D L L T Q I D
 1501 GTTTACCCATCTACCTGTAAGTAATATTTGGATGATCTTGATTTACTAACCAGATTGA
 514 L E D N P W D C S C D L V G L Q Q W I Q
 1561 CTTGAGGATAACCCCTGGGACTGCTCCTGTGACCTGGTTGGACTGCAGCAATGGATACA
 534 K L S K N T V T D D I L C T S P G H L D
 1621 AAAGTTAAGCAAGAACACAGTGACAGATGACATCCTCTGCACTTCCCCCGGGCATCTCGA
 554 K K E L K A L N S E I L C P G L V N N P
 1681 CAAAAGGAATTGAAAGCCCTAATAGTGAAATTCTCTGTCCAGGTTTAGTAAATAACCC
 574 S M P T Q T S Y L M V T T P A T T T N T
 1741 ATCCATGCCAACACAGACTAGTTACCTTATGGTCACCACTCCTGCAACAACAAATAC
 594 A D T I L R S L T D A V P L S V L I L G
 1801 GCGTGATACTATTTTACGATCTCTTACGGACGCTGTGCCACTGTCTGTCTAATATTGGG
 614 L L I M F I T I V F C A A G I V V L V L
 1861 ACTTCTGATTATGTTTCATCACTATTGTTTTCTGTGCTGCAGGGATAGTGGTTCTTGTCT
 634 H R R R R Y K K K Q V D E Q M R D N S P
 1921 TCACCGCAGGAGAAGATACAAAAGAAACAAGTAGATGAGCAAAATGAGAGACAACAGTCC
 654 V H L Q Y S M Y G H K T T H H T T E R P
 1981 TGTGCATCTTCAGTACAGCATGTATGGCCATAAAACCACTCATCACTACTGAAAGACC
 674 S A S L Y E Q H M V S P M V H V Y R S P

Фиг. 1(2)

2041 CTCTGCCTCACTCTATGAACAGCACATGGTGAGCCCCATGGTTTCATGTCTATAGAAGTCC
 694 S F G P K H L E E E E E R N E K E G S D
 2101 ATCCTTTGGTCCAAAGCATCTGGAAGAGGAAGAGAGAGGAATGAGAAAGAAGGAAGTGA
 714 A K H L Q R S L L E Q E N H S F L T G S
 2161 TGCAAAACATCTCCAAAGAAGTCTTTTGGAAACAGGAAATCATTCACTCAACAGGGTTC
 734 N M K Y K T T N Q S T E F L S F Q D A S
 2221 AAATATGAAATACAAAACCAACGAACCAATCAACAGAATTTTATCCTTCCAAGATGCCAG
 754 S L Y R N I L E K E R E L Q Q L G I T E
 2281 CTCATTGTACAGAAACATTTTAGAAAAAGAAAGGAACTTCAGCAACTGGGAATCACAGA
 774 Y L R K N I A Q L Q P D M E A H Y P G A
 2341 ATACCTAAGGAAAAACATTGCTCAGTCCAGCCTGATATGGAGGCACATTATCCTGGAGC
 794 H E E L K L M E T L M Y S R P R K V L V
 2401 CCACGAAGAGCTGAAGTTAATGGAACATTAATGTACTACGTCACAGGAAGGTATTAGT
 814 E Q T K N E Y F E L K A N L H A E P D Y
 2461 GGAACAGACAAAAATGAGTATTTTGAACCTAAAGCTAATTTACATGCTGAACCTGACTA
 834 L E V L E Q Q T *
 2521 TTTAGAACTCTGGAGCAGCAACATAGatggaga

Фиг. 1(3)

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности антител к 158P1D7
кДНК (SEQ ID NO: 3) и аминокислотная последовательность
(SEQ ID NO: 4) тяжелой цепи **Ha15-10ac12**.

**Варибельная область тяжелой цепи подчеркнута дважды,
а константная область тяжелой цепи IgG2 человека подчеркнута**

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
1 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
61 TCCTGTGCAGCGCTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGCGCT
P G R G L E W V A V I W Y D G S N Q Y Y
121 CCAGGCAAGGGGCTGGAATGGCTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATCAATATTAT
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L F
181 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACCGTGT
L Q M H S L R A E D T A V Y Y C A K G L
241 CTGCAAAATGCACACCTTCAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTACTGTCCGAGAGCTTCG
T S G R Y G M D V W G Q G T T V T V S S
301 ACTTCTGGACGGTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGACACGGTCACCGTCTCTCTCA
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E
361 GCCTCCACCAAGGCCCATCGGTCTTCCCTCGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG
S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
421 AGCAGAGCGGCGCTGGGCTGCTGTGCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTG
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
481 TGGAACTCAGGCGCTCTGACCAAGCGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCTCA
G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
541 GGACTCTACTCTCAGCAGCGTGGTGACCTGCGCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGAAC
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R
601 TACACCTGCAACCTAGATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGTGTGAGCGC
K C C V E C F P C P A P P V A G F S V F
661 AAATGTTGTGTGAGTGCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C
721 CTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCGCTGAGGTACAGTGC
V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G
781 GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAACCCCGAGGTCCAGTTCACCTGGTACGTGGACGGC
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R
841 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCAGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCT
V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
901 GTGGTCAGCGTCTCTACCGTGTGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
K V S N K G L P A P I E R T I S K T K G
961 AAGGTCTCCAACAAAGGCGCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCAAGGG
Q P R R E P Q V Y T L F P S R E E M T K N
1021 CAGCCCCGAGAACCCAGGTCTACACCTTGCCTCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAAC
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
1081 CAGGTTCAGCTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
1141 GAGAGCAATGGGAGCGCGAGAACAACTACAGACCCACACCTCCCATGCTGCACTCCGAC
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
1201 GGCTCTCTCTTCTTACAGCAAGCTCACCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
1261 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTC
S L S P G K *
1321 TCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

Фиг. 2A

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности антител к 158P1D7
кДНК (SEQ ID NO: 3) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4)
легкой цепи **Ha15-10ac12**. **Варибельная область легкой цепи подчеркнута
дважды, а константная область kappa-цепи человека подчеркнута**

D I V M T Q S P L S L P V T F G E P A S
1 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGCCCTCC
I S C R S S Q S L L L S H G F N Y L D W
61 ATCTCTGCAGGTCTAGTCAGAGCTCTGCTTACTCATGGATTCAACTATTGATTGG
Y L Q K P G G Q S P Q L L I Y L G S S R A
121 TACCTGCAGAGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCTGATCTATTGGGTCTAGTCCGGGCC
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
181 TCCGGGGTCCCTGACAGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTACACTGAAAATC
S R V E A E D V G L Y Y C M Q P L Q I P
241 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCTTTATTACTGCATGCAACCCCTACAAATTCCG
W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V
301 TGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACCTGTGGCTGCACCATCTGTC
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
361 TCACTCTCCCGCATCTGATCAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCTG
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
421 CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
481 TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
541 AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAA
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
601 GTCAACCATCAGGCGCTGAGCTCGCCCTCTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

Фиг. 2B

Аминокислотные последовательности антител к 158P1D7
Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 7)
тяжелой цепи H₁₅₋₁₀ac12. Вариабельная область тяжелой цепи
подчеркнута дважды, а константная область IgG2 человека подчеркнута

1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVROAPGKGLEWVAV
51 INYDGSNOYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMHSIRAEETAVYYCARGL
101 TSGRYGMDVWGOGTTVTVSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
151 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
201 YTCNVDDHKFQNTKVDKTVERRKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPFKPKDTL
251 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
301 VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
351 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPMLDSD
401 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГ. 3А

Аминокислотные последовательности антител к 158P1D7
Аминокислотная последовательность (SEQ ID No:8)
легкой цепи Na15-10ac12.
Вариабельная область легкой цепи подчеркнута дважды,
а константная область каппа-цепи человека подчеркнута

1 DIVMTQSFLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLLSHGFFNYLDWYLOKPGQSPQ
51 LLIYLGLSSPASGVPRFRSGSGSGTDFTLKISRVEADVGLYYCMQPIQIP
101 WTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFREAK
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
201 VTHOGLSSPVTKSFNRGEC

ФИГ. 3В

Выравнивание антител Na15-10ac12 с Ig зародышевой линии человека
Выравнивание тяжелой цепи Na15-10ac12 с Ig зародышевой линии человека

[illegible]

FIG. 4A

				-----><-----CDR3----->	
				Y Y C A R G L T S G R Y G M D V W G Q G T T V T	
	Ha15-10ac12VH	281	ATTACTGT	GCGAGAGGTCTGACTTCTGGACGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC	350
				Y Y C A R G L T S G R Y G M D V W G Q G T T V T	
98.3 (290/295)	IGHV3-33*01	281			295
100 (5/5)	IGHD4-17*01	1			5
100 (48/48)	IGHJ6*02	15			52
ID%					
				V S S	
	Ha15-10ac12VH	351	CGTCTCCTCA	360	
				V S S	
98.3 (290/295)	IGHV3-33*01		-----		
100 (5/5)	IGHD4-17*01		-----		
100 (48/48)	IGHJ6*02	53		62	

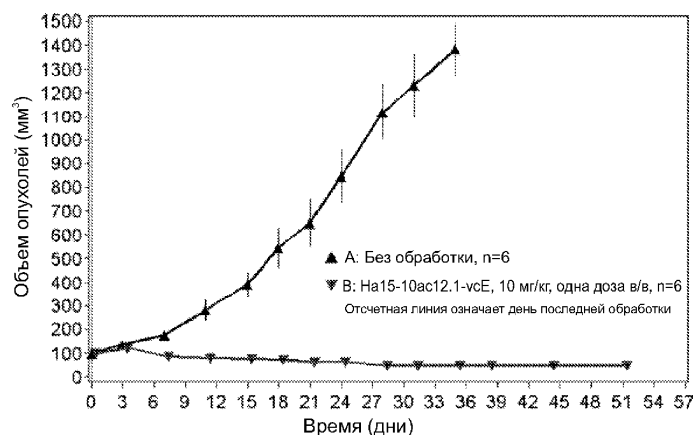
Фиг. 4A(2)

Выравнивание антител Ha15-10ac12 с Ig зародышевой линии человека
Выравнивание легкой цепи Ha15-10ac12 с Ig зародышевой линии человека

ID%				<-----FWR1----->	
	Ha15-10ac12VL	1	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCTGCA	70	
97.0 (290/299)	IGKV2D-28*01	1			70
100 (38/38)	IGKJ1*01				
ID%				<-----CDR1----->	
	Ha15-10ac12VL	71	GGTCTAGT CAGAGCCTCTGCTTAGTCAATG---GATTCAACTAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG	137	
97.0 (290/299)	IGKV2D-28*01	71			137
100 (38/38)	IGKJ1*01				
ID%				<-----CDR2----->	
	Ha15-10ac12VL	138	GCAGTCTCCACAACTCTGATCTAT TTGGGTCTT AGTCGGGCTCCGGGCTCCCTGACAGGTTCATGSGC	207	
97.0 (290/299)	IGKV2D-28*01	138			207
100 (38/38)	IGKJ1*01				
ID%				<-----FWR3----->	
	Ha15-10ac12VL	208	AGTGGATCAGGCACAGATTTCACCTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCTTTATTACT	277	
97.0 (290/299)	IGKV2D-28*01	208			277
100 (38/38)	IGKJ1*01				
ID%				<-----CDR3----->	
	Ha15-10ac12VL	278	GC ATGCAACCCCTACAAATTCCTGGACGTTCCGGCCAAGGACCAAGGTGGAAATCAAAC	337	
97.0 (290/299)	IGKV2D-28*01	278			299
100 (38/38)	IGKJ1*01	1			38

Фиг. 4B

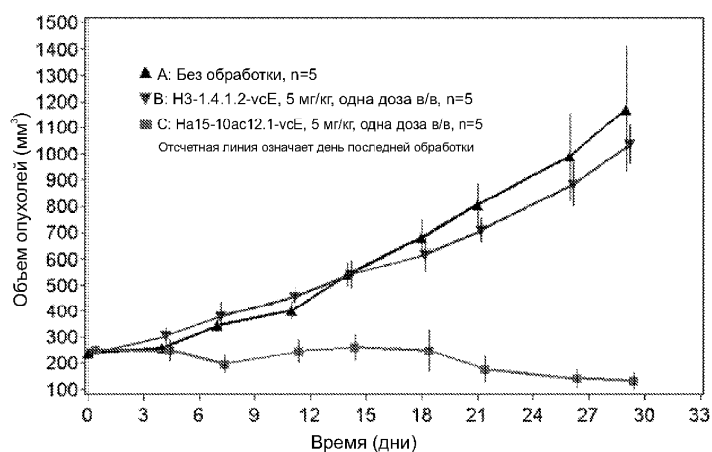
Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно
ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека AG-B7 у мышей SCID
SQ 09-041



Примечание. Посторонние схемы лечения в этом опыте не представлены

Фиг. 5

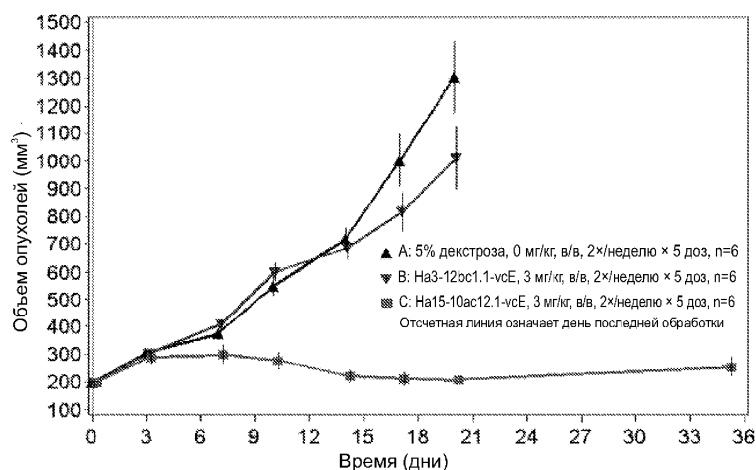
Эффективность Na15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека RT-4-XCL у мышей SCID
SQ 09-083



Примечание. Посторонние схемы лечения в этом опыте не представлены

Фиг. 6

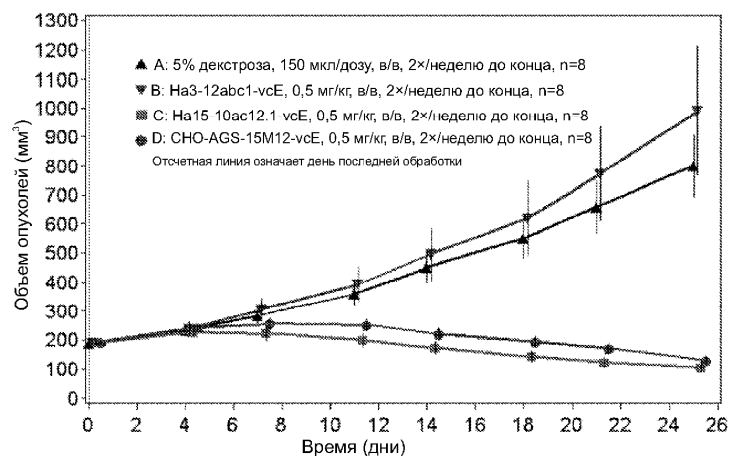
Эффективность Na15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака легких человека NCI-H322M-XCL у мышей SCID
SQ 11-031



Примечание. Посторонние схемы лечения в этом опыте не представлены

Фиг. 7

Эффективность Na15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека AG-B7 у мышей SCID
SQ10-089

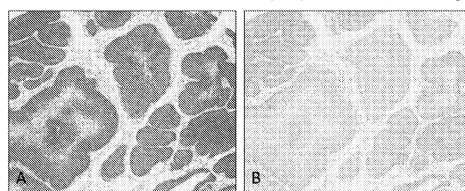


Примечание. Посторонние схемы лечения в этом опыте не представлены

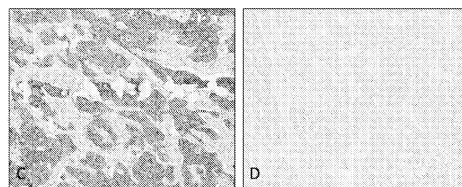
Фиг. 8

Выявление белка 158P1D7 методом иммуногистохимии

Выявление белка 158P1D7 при раке мочевого пузыря



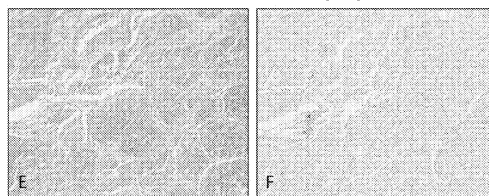
Фиг. 9А-9В



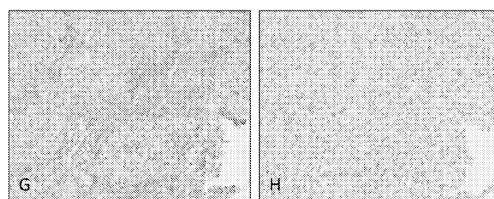
Выявление белка 158P1D7 при раке молочной железы

Фиг. 9С-9D

Выявление белка 158P1D7 при раке легких



Фиг. 9Е-9F

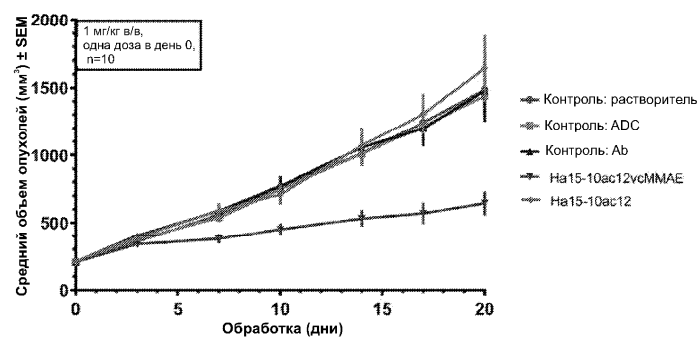


Выявление белка 158P1D7 при глиобластоме

Фиг. 9G-9H

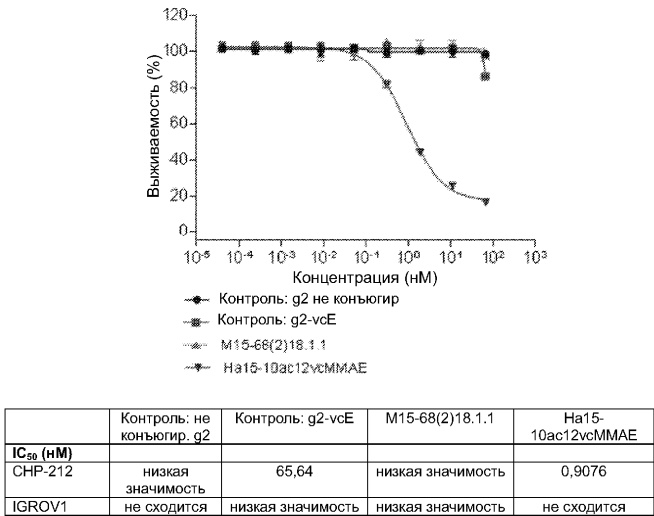
Эффективность Na15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря человека SW780 у мышей SCID

Подкожные ксенотрансплантаты Sw780



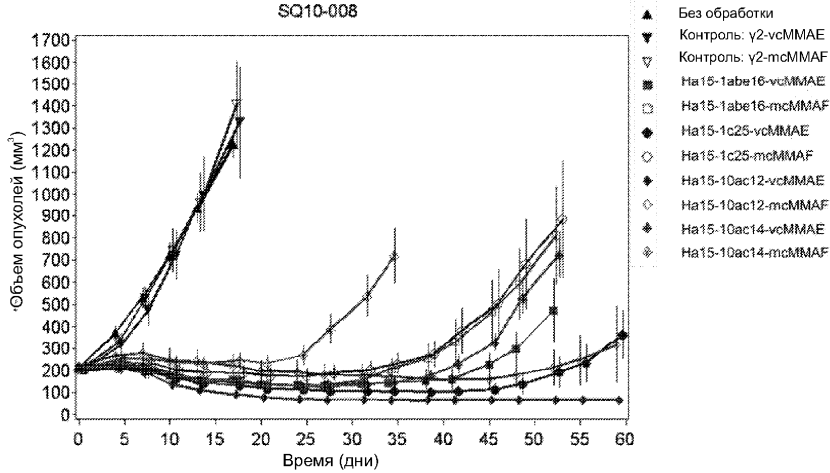
Фиг. 10

Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE in vitro при анализе цитотоксичности для СНР-212 по сравнению с M15-68(2)18 (иначе 68(18)1.1)



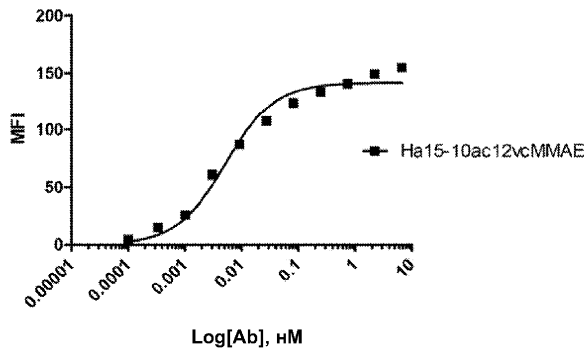
Фиг. 11

Эффективность Ha15-10ac12vcMMAE на модели привитых подкожно полученных от пациента ксенотрансплантатов рака мочевого пузыря AG-B8 у мышей SCID SQ10-008



Фиг. 12

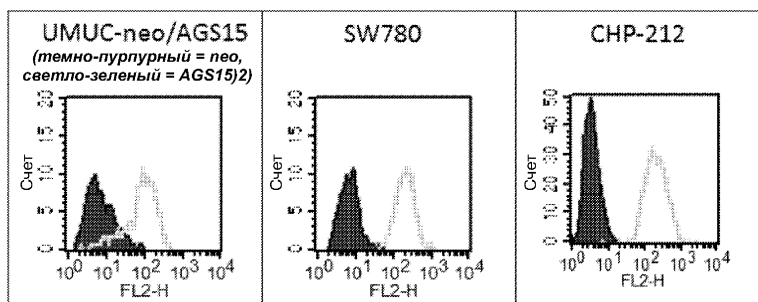
Кривая насыщения для Ha15-10ac12vcMMAE на клетках SW780.



	Ha15-10ac12vcMMAE
Bmax	141.9
Kd	0.005286

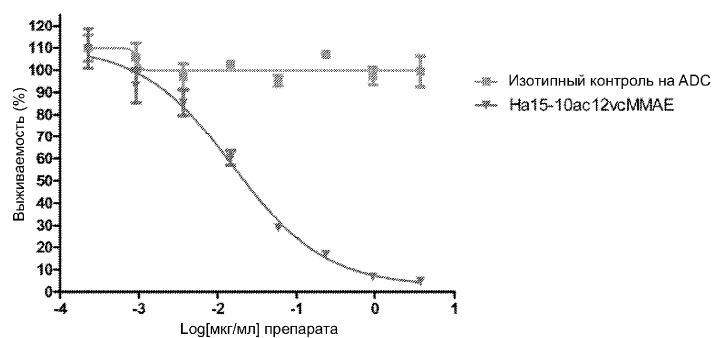
Фиг. 13

Связывание Ha15-10ac12vcMMAE с клетками UMUC-AGS15, SW780 и CHP-212 по данным FACS



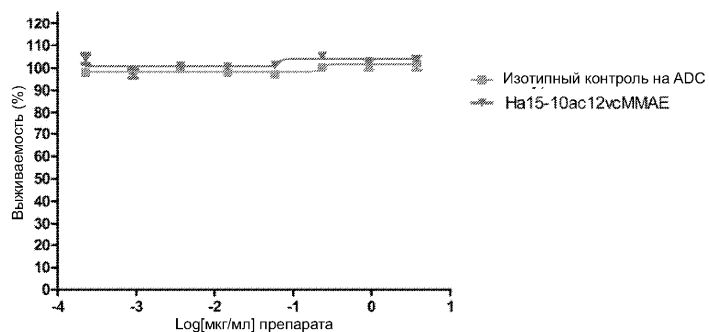
Фиг. 14

Оценка цитотоксичности Ha15-10ac12vcMMAE in vitro на клетках CHP-212 и IGROV-1
CHP-212



Фиг. 15А

Оценка цитотоксичности Ha15-10ac12vcMMAE in vitro на клетках CHP-212 и IGROV-1
IGROV-1



Фиг. 15В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2